

Mestrado Integrado em Engenharia Química

Determinação de Parâmetros Cinéticos de Biofilmes formados por *Pseudomonas fluorescens*

Tese de Mestrado

desenvolvida no âmbito da disciplina de

Projecto de Desenvolvimento em Ambiente Académico

Joana Maria Ferreira Ramos



Departamento de Engenharia Química

Orientador: **Doutor Luís Melo**

Professor Catedrático

Co-orientadora: **Doutora Olga Nunes**

Professora Auxiliar

Julho de 2008

Agradecimentos

Ao terminar este projecto resta-me registar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a realização deste trabalho:

Ao Doutor Luís Melo por me ter confiado a execução deste trabalho. A sua orientação científica, compreensão, apoio e incentivos prestados, foram essenciais à realização e conclusão do projecto.

À Doutora Olga Nunes cujos conhecimentos científicos na área de microbiologia e apoio constante, profundamente me ajudaram.

À Faculdade de Engenharia e em particular ao Departamento de Engenharia Química a disponibilização das instalações e dos seus diferentes recursos ao longo da realização do trabalho.

À s Engenheiras Carla Ferreira e Ana Pereira agradeço a orientação técnica e científica disponibilizada no arranque deste projecto, que contribuiu profundamente para a sua realização.

Aos técnicos de Departamento, nomeadamente, à Engenheira Sílvia e à Sra. Paula a colaboração prestada.

A todos os meus amigos o apoio e incentivo que me prestaram em todos os momentos.

Aos meus Pais e irmã reconheço o infindável apoio e compreensão ao longo de todo o trabalho.

Resumo

Palavras Chave: Biofilme *Pseudomonas fluorescens* Modelo Parâmetros Cinéticos

A formação de biofilmes afecta, gravemente, a indústria e a saúde da população. O controlo da formação de biofilmes é um processo complexo porque são vários os factores que influenciam a sua evolução e estrutura. No entanto, o estudo científico do biofilme permitiu o desenvolvimento de modelos que ajustam expressões matemáticas ao crescimento do biofilme. O principal objectivo deste projecto foi a determinação de parâmetros cinéticos de desenvolvimento de biofilme para a bactéria *Pseudomonas fluorescens* em que o factor limitante era a concentração de carbono orgânico facilmente assimilável fornecida ao biofilme.

Com o objectivo de estudar a cinética de formação de biofilmes pela *Pseudomonas fluorescens* o trabalho realizado foi dividido em varias tarefas:

- Estudo da influência do regime de escoamento hidráulico e a concentração de carbono facilmente assimilável fornecida ao biofilme na massa e espessura do biofilme. Para tal, foram realizados diversos ensaios de formação de biofilme num reactor de célula de fluxo testando, simultaneamente, o regime de escoamento hidráulico, turbulento e laminar, e a concentração em nutrientes.
- Efectuou-se a quantificação celular do biofilme através de microscopia de epifluorescência associada a diferentes corantes, nomeadamente, DAPI, CTC, e o kit Live/Dead.

A realização do trabalho permitiu concluir que:

- A acumulação de biofilme nas superfícies de adesão aumenta com o aumento da concentração de nutrientes;
- A acumulação de biofilme nas superfícies de adesão é maior quando em regime laminar em relação a regime turbulento para as mesmas concentrações de nutrientes;
- A quantificação celular através do DAPI permite concluir que a multiplicação celular aumenta consideravelmente a partir das 50 primeiras horas;
- A quantificação celular através do kit Live/Dead permitiu determinar o carácter da penetração de substrato, esta penetração foi classificada como parcial;

Foram também determinados diferentes parâmetros cinéticos, nomeadamente, m_f^* (massa máxima de biofilme por unidade de área), J_p (fluxo de formação de biofilme), r_s^* (taxa de consumo de substrato), μ_p (taxa específica de crescimento de biofilme), e $Y_{F/S}$ (taxa de rendimento em biomassa) e ainda $1/b$ (resistência do biofilme ao desprendimento), para quatro concentrações diferentes de nutrientes, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm em regime turbulento, com um número de Reynolds igual a 5800. Determinou-se também o valor da constante de afinidade, K_s , igual a $0,02 \text{ kg.m}^{-3}$, da taxa específica máxima de crescimento de biofilme, μ_{pmax} , igual a $0,023 \text{ h}^{-1}$, da difusividade da glucose no biofilme, D_f , igual a $2,01.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, da constante de velocidade para a reacção de ordem zero, K_{0f} , igual a $1,71.10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$, e ainda, da constante de velocidade para a reacção de ordem um, k_{1f} , igual a $0,045 \text{ s}^{-1}$.

Abstract

Key words: Biofilm *Pseudomonas fluorescens* Model Kinetic Parameters

The formation of biofilm seriously affects the industry and the health of the population. The control of biofilm formation is a complex process as there are several factors which influence its development and structure. However, the scientific analysis of biofilm has allowed the development of models that adjust mathematical expressions to the growth and development of biofilm. The main goal of this project was to determine kinetic parameters that influence the development of biofilm of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in which the limiting factor was the concentration of easily assimilable organic carbon, supplied to the biofilm.

In order to study the kinetic formation of biofilm through *Pseudomonas fluorescens* the project was divided into several tasks:

- Study of the influence of the hydraulic flow regime and easily assimilated organic carbon concentration (glucose) on the mass and thickness of the biofilm. As such, several essays of biofilm formation were carried out in a flow cell reactor, at different flow regimes, turbulent and laminar, and different concentration of nutrients.
- The cellular quantification of the biofilm was determined through fluorescence microscopy associated to different dyes, namely DAPI, CTC and the Live/Dead Kit.

This study/analysis/project led to several conclusions, namely:

- The accumulation of biofilm on the adhesion surfaces increases with higher concentrations of nutrients;
- The accumulation of biofilm on the adhesion surfaces is higher in laminar regime when compared to the turbulent regime, for equal concentrations of nutrients;
- The cellular quantification through DAPI allows to conclude that cellular multiplication increases considerably after the first 50 hours;
- The cellular quantification through Live/Dead Kit determined the penetration character of the substrate. The said penetration was partial;

Different kinetic parameters have also been determined, namely m_f^* (maximum mass of biofilm at steady state), J_p (biofilm production rate), r_s^* (substrate consumption rate), μ_p (specific biofilm production rate), $Y_{F/S}$ (biofilm yield) and $1/b$ (biofilm resistance to detachment) for four different concentrations, that is to say 20, 80, 150 and 220 ppm in turbulent regime, with Reynolds equal to 5800. Several kinetics parameters were also determine, namely, the saturation constant, k_s , equal to 0,02 kg.m^{-3} , the maximum specific biofilm production rate, $\mu_{p\text{max}}$, equal to 0,023 h^{-1} , the glucose diffusivity in biofilm, D_f , equal to $2,01.10^{-10} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$, the zero order reaction constant, K_{0f} , equal to $1.71.10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$, and finally, the first order reaction constant, k_{1f} , equal to 0,045 s^{-1} .

Índice

Índice.....	i
Índice de Figuras.....	iii
Índice de Tabelas.....	vi
Simbologia.....	vii
 Capítulo 1_Introdução.....	 1
1.1 Conceito de Biofilme.....	2
1.2 Vida e Etapas de Desenvolvimento do Biofilme.....	3
1.2.1 Transporte.....	3
1.2.2 Adesão.....	3
1.2.3 Maturação.....	4
1.2.4 Desprendimento	4
1.3 Factores que afectam o Biofilme.....	5
1.3.1 Factores Químicos.....	5
1.4 Monitorização de Biofilmes.....	7
1.5. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	7
1.6 Modelo matemático de desenvolvimento de um Biofilme.....	8
1.6.1 Biofilme espesso.....	9
1.6.2 Biofilme fino.....	9
1.7. Modelo de consumo de substrato em biofilmes	10
1.8 Objectivo do trabalho.....	12
 Capítulo 2_Materiais e Métodos.....	 13
2.1 Instalação Experimental.....	14
2.1.1 Lavagem e esterilização da instalação.....	16
2.1.2 Preservação da bactéria.....	16
2.1.3 Meios de Cultura.....	16
2.2 Métodos Analíticos.....	17
2.2.1 Quantificação celular.....	17
2.2.2 Determinar a concentração de glucose -DNS.....	18
2.2.3 Determinação da massa do biofilme.....	19
2.2.4 Determinação da espessura do biofilme.....	19
2.2.5 Determinação da densidade óptica.....	19
2.2.6 Determinação do oxigénio dissolvido.....	19

2.2.7 Determinação de pH e temperatura.....	19
2.3 Monitorização do sistema.....	19
2.3.1 Amostragem de Biofilme.....	20
2.4 Inoculação do Sistema.....	20
2.5 Método de Cálculo.....	21
Capítulo 3_Analise Cinética do desenvolvimento de Biofilme.....	22
3.1 Ensaio de formação de biofilme.....	23
3.2 Comparação de Parâmetros cinéticos.....	23
3.3 Efeitos de concentração de nutrientes na célula de fluxo no desenvolvimento de biofilme.....	27
3.4 Efeitos do regime de escoamento no desenvolvimento de biofilme.....	33
3.5. Conclusões.....	36
Capítulo 4_Avaliação do trabalho realizado.....	37
4.1 Objectivos realizados	37
4.2. Limitações e trabalho futuro.....	37
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS.....	41
ANEXO A1.....	42
ANEXO A2.....	43
ANEXO B.....	46
ANEXO C.....	47
ANEXO D.....	48
ANEXO E.....	48
ANEXO F.....	49
ANEXO G	50
ANEXO H.....	51
ANEXO I.....	55
ANEXO J.....	56
ANEXO K.....	59

Índice de Figuras

Figura 1.1_Etapas de formação de biofilme: (a) Transporte dos microrganismos até à superfície, (b) Adesão e acumulação dos microrganismos na superfície, (c) Formação de microcolónias e Maturação, (d) Formação da matriz, (e) Desprendimento.....	3
Figura 1.2_Curva de formação do biofilme ao longo do tempo, incluindo as diferentes fases de crescimento e desprendimento (Pereira 2001).....	5
Figura 1.3_ Imagem obtida através de microscópio electrónico de uma estirpe de <i>Pseudomonas fluorescens</i> (www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html).....	8
Figura 2.1_ Instalação experimental utilizada nos ensaios.....	14
Figura 2.2_Representação da célula de fluxo em diferentes vistas, nomeadamente, transversal e de frente e ainda representação do cupão presente na célula de fluxo.....	14
Figura 2.3_Fotografia da instalação experimental utilizada nos ensaios.....	15
Figura 3.1_Massa de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento ($Re=5800$), para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm.....	24
Figura 3.2_Taxa de consumo de substrato por unidade de área de biofilme (r_s^*), para quatro diferentes concentrações em glucose na célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm, para regime turbulento ($Re=5800$).....	25
Figura 3.3_Taxa específica de crescimento de biofilme (μ_p), para quatro diferentes concentrações em glucose do efluente da célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm, para regime turbulento ($Re=5800$).....	25
Figura 3.4_Espessura do biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento ($Re=5800$), para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm.....	28
Figura 3.5_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método de DAPI.....	29
Figura 3.6_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método do kit Live/Dead.....	30
Figura 3.7_Número total de células vivas presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método do kit Live/Dead.....	31
Figura 3.8_Número total de células mortas presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método de Live/Dead.....	32

Figura 3.9_Densidade óptica (DO) no fermentador ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200ppm.....	33
Figura 3.10_Massa de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento e laminar, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20 ppm em regime laminar, -200 ppm em regime laminar, -20 ppm em regime turbulento, -200 ppm em regime turbulento.....	34
Figura 3.11_Espessura de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento e laminar, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20 ppm em regime laminar, -200 ppm em regime laminar, -20 ppm em regime turbulento, -200 ppm em regime turbulento.....	34
Figura 3.12_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime laminar e turbulento, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20 ppm em regime laminar, -200 ppm em regime laminar, -20 ppm em regime turbulento, -200 ppm em regime turbulento, obtido para o método de DAPI.....	35
Figura 3.13_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime laminar e turbulento, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20 ppm em regime laminar, -200 ppm em regime laminar, -20 ppm em regime turbulento, -200 ppm em regime turbulento, obtido para o método de kit Live/Dead.....	36
Figura C.1_Esquema do procedimento de recolha de amostra do biofilme aderido às superfícies de suporte, nas células de fluxo.....	47
Figura E.1_Esquema de inoculação do reactor da instalação experimental apresentando todos os passos intermédios.....	48
Figura G.1_Massa de biofilme húmido por área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento, para concentração em nutrientes igual a 200ppm.....	50
Figura H.1_Visualização de uma amostra diluída de biofilme em salina a 0,85%, formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com DAPI (ampliação 1000x).....	51
Figura H.2_Visualização de uma amostra de biofilme formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com DAPI (ampliação 1000x).....	52
Figura H.3_Visualização de uma amostra diluída de biofilme formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com DAPI (ampliação 1000x).....	53

Figura H.4_Visualização de uma amostra diluída de biofilme em salina a 0,85%, formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com CTC (ampliação 1000x).....54

Figura J.1_ Representação da massa de biofilme por unidade de área de placa, ao longo do tempo.....56

Figura K.1_Taxa específica de produção de biofilme (μ_p), para quatro diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, 200 ppm, para regime turbulento.....60

Figura K.2_Taxa de consumo de substrato (r_s^*) em função da raiz quadrada do substrato, para quatro diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo, para regime turbulento.....61

Índice de Tabelas

Tabela 1.1_Expressões do modelo de difusão-reacção aplicadas ao consumo de substrato em biofilmes.....	11
Tabela 3.1_Condições operacionais nos diferentes ensaios realizados: concentrações de glucose do efluente da célula de fluxo e regime de escoamento hidráulico aplicado.....	23
Tabela 3.2_Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo apresentando no capítulo 1, para o biofilme da <i>Pseudomonas fluorescens</i> , para regime turbulento, para diferentes concentrações de glucose no efluente da célula de fluxo.....	24
Tabela B.1_Composição dos meios de cultura.....	46

Lista de Símbolos

$1/b$	resistência ao desprendimento
A	área da célula de fluxo
d	diâmetro da célula de fluxo
d_{eq}	diâmetro equivalente da célula de fluxo
d_h	diâmetro hidráulico
\mathcal{D}	difusividade da glucose na água
D_f	difusividade da glucose no biofilme
J_p	fluxo de formação de biofilme
J_r	fluxo de desprendimento de biofilme
k_m	coeficiente de transferência de massa externo
k_{1f}	constante de velocidade da reacção de ordem 1
K_s	constante de afinidade
l	comprimento da célula de fluxo
L_f	espessura do biofilme húmido
m_f	massa de biofilme por unidade de área
Q	caudal de escoamento ao longo da célula de fluxo
r_A	velocidade de reacção baseada na área da superfície
r_s	taxa de consumo de substrato
S	concentração de substrato no seio do líquido
S_i	concentração de substrato na interface biofilme-líquido
$Y_{\frac{f}{s}}$	taxa de rendimento em biomassa

Letras Gregas

η_i	eficiência interna do biofilme
ϑ	velocidade de escoamento ao longo da célula de fluxo
μ	viscosidade do efluente da célula de fluxo
μ_p	taxa específica de crescimento de biofilme
ρ	densidade do efluente da célula de fluxo

Números Adimensionais

Re	Numero de Reynolds
Sc	Numero de Schmidt
Sh	Numero de Sherwood

Lista de Siglas

CTC	5-cyano-2,3-ditolyt tetrazolium chloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenilindole
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNS	Método do ácido di-nitríco salicílico
DO	Densidade óptica
EPS	Substancias poliméricas extracelulares
HPC	Heterotrophic Plate Count
L/D	Live/Dead
PCA	Plate Count Agar
PVC	Policloreto de Vinilo
UFC	Unidades formadoras de colónias

Capítulo 1_Introdução

Ao longo deste capítulo é realizada a revisão bibliográfica dos fundamentos teóricos que constituem os alicerces do tema estudado neste projecto. Nesta secção, efectua-se uma breve apresentação do conceito de biofilme, indicando, sucintamente, o seu processo de desenvolvimento e os factores que o influenciam. Faz-se também uma resumida descrição de um dos reactores utilizado na monitorização do biofilme e também a caracterização do microrganismo formador do biofilme, nomeadamente, a *Pseudomonas fluorescens*. Por fim, apresenta-se os modelos matemáticos de desenvolvimento do biofilme e de consumo de substrato no qual se encontram representados os parâmetros cinéticos que se pretende determinar e ainda o objectivo do projecto realizado.

1.1 Definição de Biofilme

1.2 Vida e Etapas de Desenvolvimento do Biofilme

1.3 Factores que afectam o Biofilme

1.4 Monitorização de Biofilmes

1.5 *Pseudomonas fluorescens*

1.6 Modelo matemático de desenvolvimento de um Biofilme

1.7 Modelo de consumo de substrato em biofilmes

1.8 Objectivo do trabalho

1.1 Conceito de Biofilme

Diariamente, a deposição indesejada de materiais em superfícies, designado por *fouling*, afecta, gravemente, a indústria e a saúde da população. O *fouling* divide-se em diferentes tipos: mineral (resultante da deposição de material inorgânico), orgânico (correspondente à deposição de material orgânico, tal como gorduras e proteínas entre outros), de partículas (deposição de partículas que se encontram em suspensão em soluções, como a argila e sílica), e ainda *biofouling* (causado pela agregação e crescimento de microrganismos).

O *biofouling*, também designado por biofilme, corresponde a estruturas formadas, espontaneamente, por diversos tipos de microrganismos (com predominância de bactérias) que aderem a superfícies. Estas estruturas apresentam elevada resistência aos desinfectantes e produtos anti-corrosivos que as deveriam exterminar. Os biofilmes são sistemas biológicos altamente organizados, onde as bactérias estabelecem comunidades funcionais estruturadas e coordenadas, aderentes a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica). O crescimento celular microbiológico é acompanhado pela excreção de produtos de carácter polimérico (*Extracellular Polymeric Substances-EPS*), que envolvem as células, criando, assim, uma matriz que actua como escudo protector das agressões exteriores. A parte abiótica do biofilme contém, maioritariamente, substâncias poliméricas e água, podendo esta atingir percentagens da ordem dos 95%-99% da massa da matriz hidratada (Flemming and Schaule, 1996).

Os biofilmes mais comuns na natureza são heterogéneos, compostos por várias espécies de microrganismos, podendo os produtos do metabolismo de uma espécie auxiliar o crescimento das outras e a adesão de uma dada estirpe fornecer ligandos que promovem a ligação de outras. Inversamente, a competição pelos nutrientes e a acumulação de metabolitos tóxicos, produzidos pelas espécies colonizadoras, poderão limitar a diversidade de espécies num biofilme.

Os biofilmes podem apresentar um carácter benéfico ou prejudicial. No caso de o biofilme ser prejudicial, existem diferentes formas de os eliminar, nomeadamente, através de biocidas, biodispersantes, eliminação da sua fonte de nutrientes, etc.

1.2 Vida e Etapas de Desenvolvimento do Biofilme

O padrão de desenvolvimento de um biofilme envolve diferentes etapas: o transporte das partículas microbianas até à superfície de suporte, a adesão inicial, seguida da formação de microcolónias e, na maioria dos casos, a diferenciação das microcolónias em macrocolónias, envolvidas numa matriz de exopolissacarídeos, formando biofilmes maduros.

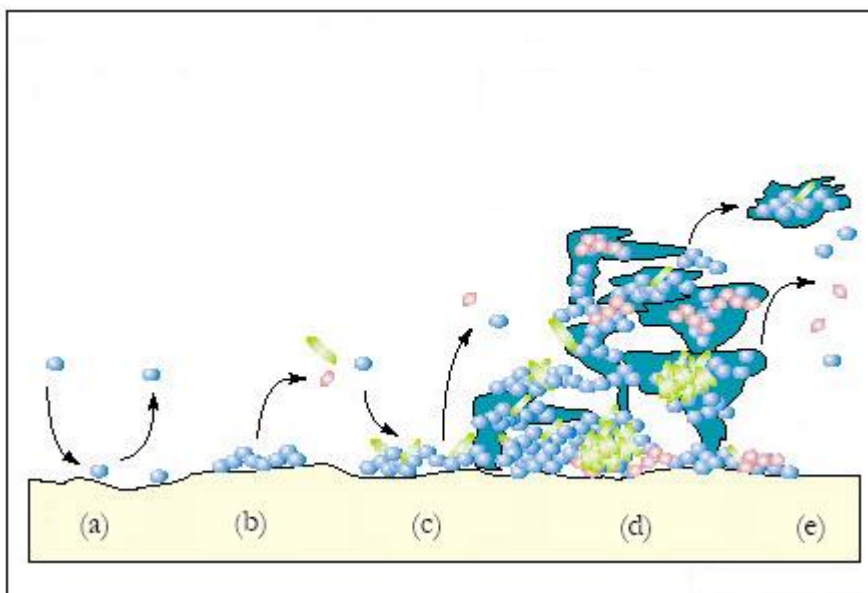


Figura 1.1_Etapas de formação de biofilme: (a) Transporte dos microrganismos até à superfície, (b) Adesão e acumulação dos microrganismos na superfície, (c) Formação de microcolónias e Maturação, (d) Formação da matriz, (e) Desprendimento (www.e-escola.pt).

1.2.1 Transporte

O transporte das bactérias até à superfície de adesão (etapa (a) da figura 1.1) pode realizar-se de diversas formas: difusão, convecção, ou ainda transporte resultante da locomoção celular, como no caso de microrganismos portadores de flagelos (Costerton, 1999).

1.2.2 Adesão

O processo de adesão de um microrganismo a uma superfície abiótica é normalmente resultado de interações inespecíficas, como por exemplo as hidrofóbicas; por outro lado, a adesão a um tecido vivo ocorre devido a mecanismos moleculares específicos de *ancoragem*, nomeadamente através de lectinas, ligandos ou adesinas.

A adesão primária de um organismo a uma superfície é um processo reversível que envolve a aproximação deste à superfície, de forma aleatória ou através de mecanismos de quimiotaxia e de mobilidade celular (etapa (b) da figura 1.1).

Quando o microrganismo celular se encontra a uma distância crítica da superfície, a possibilidade de adesão dependerá do balanço final entre forças atractivas e repulsivas geradas entre as duas superfícies. Está demonstrado que os mecanismos de mobilidade das células, dependentes de *pili* superficiais e de flagelo polar, são fundamentais no processo de iniciação de um biofilme.

1.2.3 Maturação

Depois da adesão primária, as células que se encontram fortemente ligadas entre si consolidam o processo de adesão produzindo exopolissacarídeos, que interagem com os materiais da superfície. Na inexistência de interferência mecânica ou química, a adesão torna-se, nesta etapa, irreversível (etapa (c) da figura 1.1). A densidade e complexidade do biofilme aumenta à medida que as células se dividem (ou morrem) e os componentes extracelulares gerados pelas bactérias interagem com moléculas orgânicas e inorgânicas do ambiente circundante para formar o glicocálix. Nesta etapa, os biofilmes apresentam um elevado grau de hidratação, formando-se estruturas abertas compostas por 73 a 98% de material não celular (no total da massa seca), incluindo exopolissacarídeos e canais e poros por onde circulam os nutrientes.

1.2.4 Desprendimento

A diminuição de células do biofilme pode ocorrer por dois motivos: erosão superficial e perda de porções macroscópicas de biofilme (Costerton, 1999).

A erosão ocorre simultaneamente com o crescimento do biofilme. As camadas mais externas do biofilme libertam células no estado plantónico que se podem rapidamente dispersar e multiplicar, colonizando novas superfícies e organizando novos biofilmes em diferentes zonas (etapa (e) da figura 1.1). Por outro lado, a perda de porções macroscópicas de biofilme é um processo fortuito e repentino, que origina danos numa considerável quantidade de biofilme.

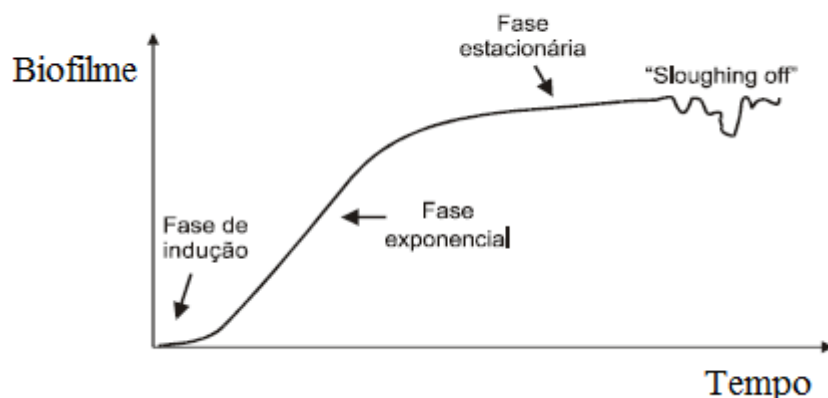


Figura 1.2_Curva de formação do biofilme ao longo do tempo, incluindo as diferentes fases de crescimento e desprendimento (Pereira 2001).

A figura 1.2 representa as diferentes fases de formação do biofilme ao longo do tempo até ao ponto em que este sofre desprendimento (*Sloughing off*).

1.3 Factores que afectam o Biofilme

Os factores que levam à perda do biofilme podem ser químicos, físicos ou biológicos.

As razões químicas que levam ao desprendimento do biofilme são a ausência de nutrientes e/ou de oxigénio, a alteração do pH, as trocas iónicas, e a acumulação de metabolitos secundários tóxicos o que origina um processo de morte celular próximo da superfície e subsequente desintegração do biofilme.

Entre os factores físicos, incluem-se a tensão de corte tangencial exercida ao longo da matriz e os gradientes de pressão osmótica no interior do biofilme.

Quanto aos factores biológicos, é de indicar que em culturas pluricelulares os diferentes microrganismos podem excretar substâncias nocivas a outras bactérias pertencentes também ao biofilme (Characklis, 1990).

1.3.1 Factores Químicos

pH

O pH do meio é um factor importante na sobrevivência e crescimento dos microrganismos, dado que estes apresentam valores de pH óptimos para o seu desenvolvimento. Dependendo do pH ideal dos microrganismos, estes podem ser classificados como: acidófilos, neutrófilos e basófilos (Stanier et al., 1995).

Para a maioria dos microrganismos o pH ideal corresponde ao pH neutro: quando o valor de pH é o ideal o metabolismo celular não é afectado negativamente, e os microrganismos desenvolvem-se normalmente.

As propriedades das superfícies, às quais os microrganismos aderem, também são afectadas pelo pH, podendo este diminuir ou aumentar a repulsão electrostática entre os dois elementos, e assim alterar a etapa de adesão do biofilme (Bott, 1993).

Temperatura

A temperatura é um parâmetro chave no desenvolvimento celular e consequentemente na formação, constituição e evolução do biofilme. Quando no habitat do microrganismo se atingem valores elevados de temperatura, ocorre a desnaturação das proteínas constituintes das células, o que leva a uma redução rápida da taxa de crescimento. Por outro lado, com a diminuição da temperatura ocorre uma diminuição da taxa de crescimento dos microrganismos, até um certo valor a partir do qual cessa completamente. O limite máximo e mínimo de temperatura varia consoante o microrganismo (Stanier et al., 1995).

Regime de escoamento

O regime de escoamento representa um papel muito importante no desenvolvimento e estabilidade do biofilme. A velocidade de escoamento do fluido irá influenciar os processos de adesão e de desprendimento do biofilme (Bott, 1993).

O regime de escoamento irá influenciar a taxa de transferência de massa do meio líquido para o biofilme. Para regime laminar, a resistência à transferência de massa, do meio líquido para os microrganismos que constituem o biofilme, é mais elevada, o que pode limitar o crescimento do biofilme. Quando em regime turbulento, a transferência de massa no meio líquido para o biofilme é facilitada, o que favorece o fornecimento de substrato para o desenvolvimento de biofilme. No entanto, neste regime, as forças de tensão de corte aumentam, o que resulta numa taxa superior de desprendimento de porções de biofilme, e consequentemente, menor massa de biofilme em adesão à superfície.

O tipo de regime hidrodinâmico a que o biofilme se encontra exposto também influencia a estrutura física do biofilme: para turbulento, obtém-se um biofilme menos espesso mas mais denso e coeso, enquanto, para laminar, este é mais espesso mas menos homogéneo podendo formar colónias isoladas (Vieira et al., 1993).

Fonte de Nutrientes

O tipo e a concentração dos nutrientes fornecidos ao biofilme são factores relevantes no desenvolvimento do mesmo. No caso das bactérias heterotróficas, quanto maior a concentração de nutrientes sob a forma de carbono facilmente assimilável disponível maior o crescimento microbiológico (Frias et al., 2001).

Tipo de material da superfície

O tipo (natureza química, hidrofobicidade), o estado de conservação e a topografia da superfície na qual aderem os biofilmes são parâmetros muito relevantes no crescimento e desenvolvimento deste. Superfícies porosas e irregulares são zonas favoráveis ao crescimento microbiológico.

1.4 Monitorização de Biofilmes

Células de Fluxo

Os reactores de biofilme são reactores biológicos, em que o material biológico se encontra aderido a superfícies e não apenas em suspensão no meio líquido.

Os reactores de células de fluxo com placas são propícios à fácil monitorização de biofilme, dado que permitem avaliar a adesão celular e também a cinética de formação do biofilme.

A célula de fluxo desenvolvida por Vieira *et al* (1993) e Pereira *et al.* (2002), consiste numa conduta semi-cilíndrica vertical, com fluxo contínuo, na qual, na face plana, se encontram placas para a amostragem do biofilme. Neste tipo de sistema é facilmente controlado o caudal, a concentração dos nutrientes, o pH, e a temperatura.

1.5 *Pseudomonas fluorescens*

A *Pseudomonas fluorescens* é uma bactéria Gram-negativa, aerobia, da família *Pseudomonadacea*, que não forma esporos. A sua morfologia corresponde a um bastonete, e é facilmente encontrada na água e nos solos, sendo bastante versátil, no que diz respeito, à sua fonte de nutrientes (Bailey *et al.*, 1986).

A sua temperatura de crescimento óptima está compreendida entre 25 e 30°C, a pH neutro.

A *Pseudomonas fluorescens* forma biofilme com muita facilidade em diferentes condições de crescimento. O carácter do biofilme é afectado por diferentes factores, nomeadamente, a composição e pH do meio, a pressão ósmotica, e o oxigénio dissolvido (Bailey et al., 1986).

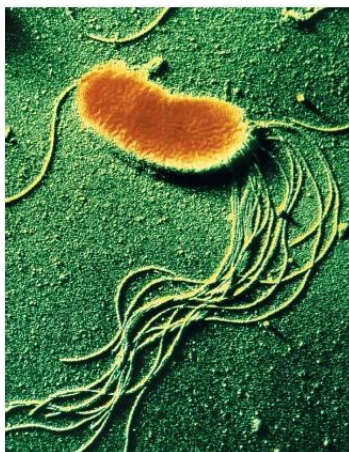


Figura 1.3_ Imagem obtida através de microscópio electrónico de uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens* (www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html).

1.6 Modelo matemático de desenvolvimento de um Biofilme

O estudo científico do biofilme permitiu o desenvolvimento de modelos que ajustam expressões matemáticas ao crescimento e evolução do biofilme. A seguinte equação matemática expressa o desenvolvimento da biomassa ao longo do tempo:

$$\frac{dm_f}{dt} = J_p - J_r \quad (1)$$

Em que m_f corresponde à massa de biofilme por unidade de área, J_p corresponde ao fluxo de formação de biofilme e J_r corresponde ao fluxo de desprendimento do biofilme.

A variação do valor de m_f deve-se ao balanço material entre a produção de biomassa, pelos microrganismos presentes no biofilme, e o desprendimento do mesmo, devido a forças hidrodinâmicas (Melo, 1999).

O valor de J_r é proporcional à massa de biofilme formada (m_f), pois a probabilidade de desprendimento aumenta com o aumento de zonas mais frágeis, zonas estas, que são em maior número num biofilme espesso do que num fino. O valor de b é proporcional às forças hidrodinâmicas que operam sobre o biofilme, e é

inversamente proporcional à coesão do biofilme. Relacionando-se estas três variáveis obtém-se a seguinte expressão:

$$J_r = b \cdot m_i \quad (2)$$

Consoante o tipo de biofilme em estudo o modelo altera-se, existindo expressões diferentes para biofilme espesso e fino.

1.6.1 Biofilme espesso

Um biofilme espesso, no qual existe uma parcial penetração de substrato, apresenta uma camada externa activa e uma camada interna inactiva, próxima da superfície de adesão. A primeira apresenta as células com melhor actividade metabólica, enquanto que a segunda apresenta células com reduzida actividade metabólica e ainda material polimérico. A espessura da camada activa é constante e corresponde ao valor máximo de penetração do substrato, enquanto que a camada inactiva pode aumentar ao longo do tempo devido à produção de material polimérico pelos microrganismos da camada externa (Melo, 1999).

Considerando que μ_p corresponde à massa de biofilme produzida pela camada activa, por unidade de tempo, e por unidade de massa total de biofilme (taxa específica de crescimento de biofilme) obtém-se a seguinte expressão:

$$\mu_p = (\mu_p)_a \cdot \frac{(m_f)_a}{m_t} \quad (3)$$

Em que μ_p é a taxa específica de biofilme (células + polímeros) produzida pela camada externa e $(m_f)_a$ é a massa da camada activa por unidade de superfície de área. Sendo assim, obtém-se a seguinte equação:

$$J_p = \mu_p \cdot m_t = (\mu_p)_a \cdot (m_f)_a = \text{constante} \quad (4)$$

1.6.2 Biofilme fino

Quando na presença de um biofilme pouco espesso, em que a penetração de substrato é completa ao longo do biofilme, este encontra-se completamente activo em relação ao substrato em questão. Logo:

$$\mu_p = (\mu_p)_a \quad (5)$$

Durante a formação de biofilme o aumento de massa não é linearmente proporcional ao aumento do número de microrganismos, dado que a camada activa não está apenas envolvida na multiplicação celular, mas também na produção de material polimérico (Melo, 1999).

$$\mu_p = (\mu_p)_a \cdot \frac{1}{(m_f)_a} \quad (6)$$

Considerando o caso do biofilme em que todo este se encontra activo o valor de m_f é igual a m_{fa} , pelo que se obtém a seguinte expressão:

$$J_p = (\mu_p)_a \cdot (m_f)_a = \text{constante} \quad (7)$$

Para ambos os casos, o valor de J_p é constante logo:

$$\frac{dm_f}{dt} = J_p - b \cdot m_f \quad (8)$$

Após integração, obtém-se a expressão que representa o modelo final:

$$m_f = m_f * [1 - \exp(-b \cdot t)] \quad (9)$$

Através do ajuste das equações (8) e (9) às curvas de crescimento de biofilme é possível obter os valores de J_p e μ_p .

1.7. Modelo de consumo de substrato em biofilmes

O modelo mais utilizado para descrever o consumo de substrato em biofilmes é o de difusão-reacção e foi adaptado por Harremões (1987) a partir do modelo desenvolvido em catálise química heterogénea.

No presente trabalho, a taxa de consumo de substrato (r_s^*) foi calculada a partir dos valores medidos do caudal da alimentação e das concentrações de glucose à entrada e à saída do sistema de fluxo.

As expressões do modelo de difusão-reacção aplicadas ao consumo de substrato em biofilmes estão descritas em Melo e Oliveira (2001) e encontram-se resumidas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1_Expressões do modelo de difusão-reacção aplicadas ao consumo de substrato em biofilmes.

CINÉTICA INTRÍNSECA DE <u>1ª ORDEM</u>	CINÉTICA INTRÍNSECA DE <u>ORDEM ZERO</u>
$r_s = \frac{S}{\frac{1}{k_m} + \frac{1}{\eta_i k_{1f} L_f}} \quad (10)$	<p><u>Caso Geral</u></p> $r_s = \frac{k_m S}{2\lambda^2} \left[\sqrt{1 + 4\lambda^2} - 1 \right] \quad (14)$
$\eta_i = \frac{\tanh \phi}{\phi} \quad (11)$	<p>sendo: $\lambda = \frac{k_m \sqrt{S}}{\sqrt{2k_{of} D_f}} \quad (15)$</p>
$\phi = \sqrt{\frac{k_{1f} L_f^2}{D_f}} \quad (12)$	<p><u>Casos Particulares - quando a transferência de massa externa NÃO é limitante</u></p>
<p>ϕ - Módulo de Thiele para reacção de 1ª ordem</p>	<p>(a) Biofilme <u>totalmente penetrado</u> pelo substrato:</p>
<p>As constantes k_{1f} e k_{of} estão relacionadas pela expressão:</p>	$r_s = k_{of} L_f = \frac{(k_{1/2})_{app}^2}{2D_f} \quad (16)$
$k_{of} = 2k_{1f} \cdot K_s \quad (13)$	<p>em que: $(k_{1/2})_{app} = \sqrt{2k_{of} D_f} \quad (17)$</p>
<p>K_s - constante de afinidade de Monod</p>	<p>(b) Biofilme <u>parcialmente penetrado</u> pelo substrato:</p>
	$r_s = k_{of} L_f \beta = \sqrt{2k_{of} D_f S} \quad (18)$
	<p>OU: $r_s = (k_{1/2})_{app} \sqrt{S}$</p>
	<p>com: $\beta = \sqrt{\frac{2D_f S}{k_{of} L_f^2}} \quad (19)$</p>
	<p>β - grau (fracção) de penetração do substrato</p>

A aplicação dos dois modelos mencionados anteriormente, permite ainda a determinação da taxa de rendimento em biomassa. Esta é calculada recorrendo a fórmula seguinte:

$$Y_{F/S} = \frac{\mu_p \cdot \rho_f \cdot L_f}{r_s} \quad (20)$$

Em que, L_f corresponde à espessura do biofilme húmido, e ρ_f corresponde à densidade do efluente da célula de fluxo.

1.8 Objectivo do trabalho

O principal objectivo deste projecto foi a determinação de parâmetros cinéticos de desenvolvimento de biofilme para a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, em que o factor limitante era a concentração de substrato fornecido ao biofilme.

Para tal, realizaram-se ensaios a diferentes concentrações de substrato orgânico, de forma a obter os dados necessários à caracterização cinética dos modelos apresentados na secção 1.6 e 1.7. Em paralelo, foi estudado o impacto do regime de escoamento no desenvolvimento do biofilme.

Capítulo 2_Materiais e Métodos

Este capítulo apresenta a metodologia experimental aplicada ao longo do trabalho realizado, incluindo a descrição da instalação experimental e dos diferentes métodos analíticos aplicados. Ao longo desta secção encontra-se também descrito o procedimento de monitorização do desenvolvimento do biofilme e também as condições testadas ao longo dos diferentes ensaios.

2.1 Instalação Experimental

2.2 Métodos Analíticos

2.3 Monitorização do Biofilme

2.4 Inoculação

2.5 Métodos de Cálculo

2.1 Instalação Experimental

Com o objectivo de determinar os parâmetros cinéticos de formação de biofilme pela *Pseudomonas fluorescens*, em células de fluxo, a diferentes regimes e a diferentes concentrações de substrato, foram realizados ensaios recorrendo à instalação experimental apresentada a seguir.

A instalação consiste num fermentador ligado a uma célula de fluxo.

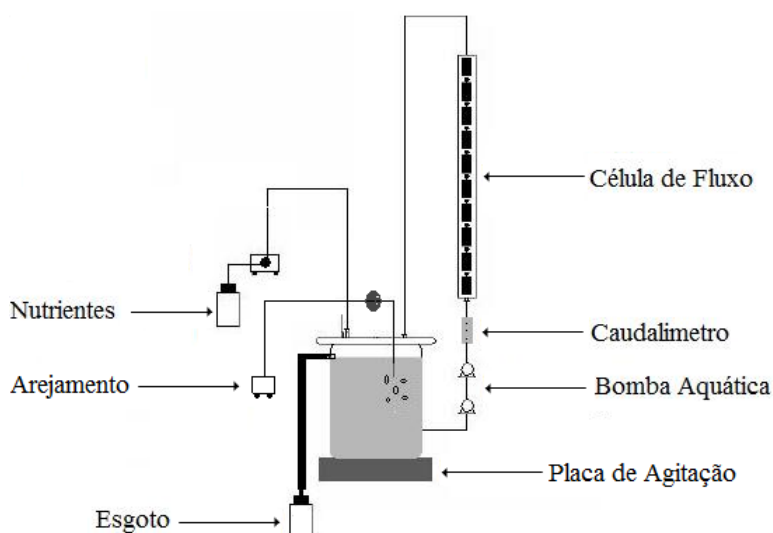


Figura 2.1_ Instalação experimental utilizada nos ensaios.

A célula de fluxo foi construída em acrílico (Perpex), e consiste num semicilindro com um comprimento igual a 85 cm e um diâmetro equivalente igual a 3,2 cm. Incorporados na célula encontram-se dez cupões rectangulares de face plana de fácil remoção, que contêm as superfícies de suporte no qual se desenvolve o biofilme.

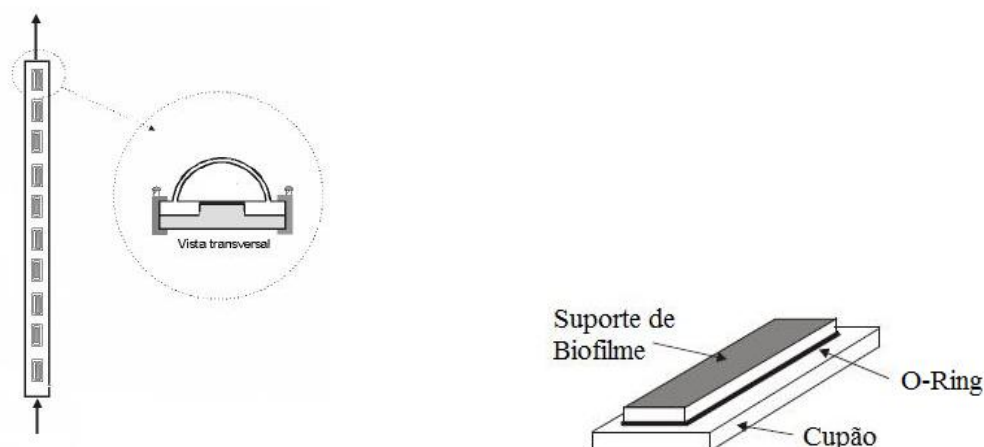


Figura 2.2_ Representação da célula de fluxo em diferentes vistas, nomeadamente, transversal e de frente e ainda representação do cupão presente na célula de fluxo.

Os cupões são de acrílico com suportes de biofilme em PVC que apresentam uma área superficial igual a 2 cm^2 , colados aos cupões com cola. Os cupões apresentam um o-ring que actua como vedante do sistema. Ao longo dos ensaios os cupões são removidos sequencialmente para se obter o biofilme formado sendo em seguida substituídos por cupões idênticos.

A instalação apresenta um fermentador que corresponde a um tanque em acrílico, com recirculação, de volume útil igual a 4000 cm^3 . Este encontra-se ligado à célula de fluxo por duas bombas aquáticas (Agimatic-N, J.P.Selecta, SA, mod. 7000243). O caudalímetro (Key Instruments, LPH 600) instalado permite variar o caudal.

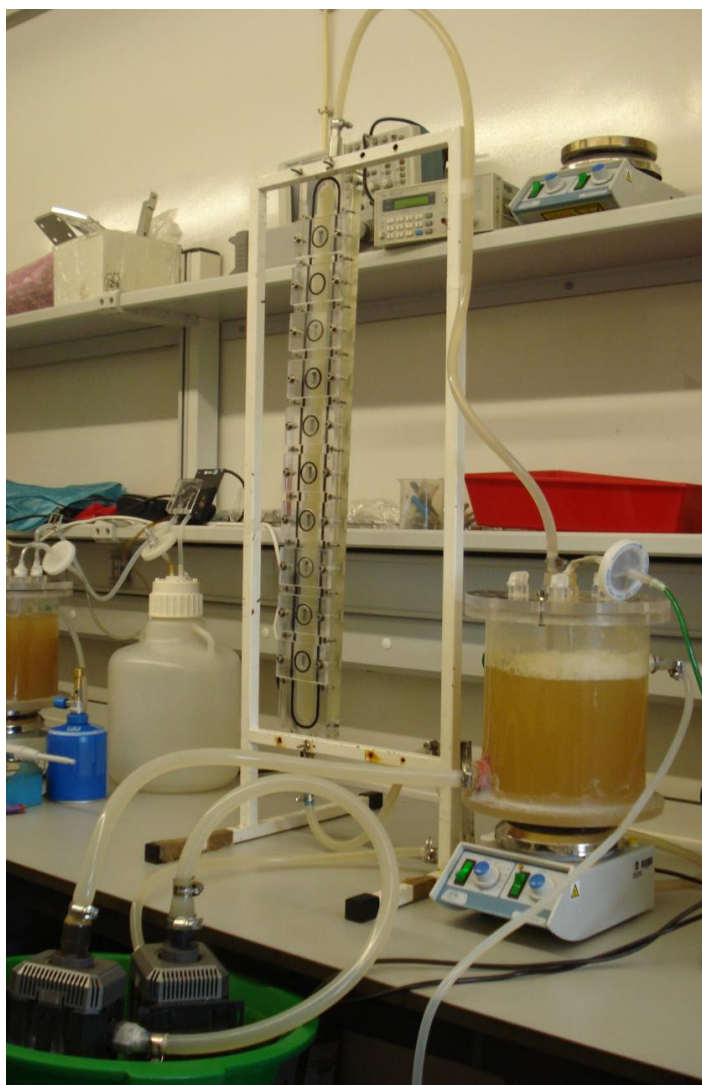


Figura 2.3_Fotografia da instalação experimental utilizada nos ensaios.

Ao longo do trabalho realizado foi utilizada a mesma estirpe de *Pseudomonas fluorescens*, nomeadamente, a ATCC 13515.

2.1.1 Lavagem e esterilização da instalação

A instalação era completamente esvaziada e lavada após cada ensaio de forma a remover todo o biofilme que se encontrava agregado ao sistema e obter as melhores condições possíveis de asséptica. O material utilizado na construção das diferentes peças de equipamento não suporta elevadas temperaturas, pelo que a descontaminação realizada foi de carácter químico.

Antes de um novo ensaio toda a instalação era desinfetada com lixívia diluída (10%), e em seguida em circuito fechado circulava uma nova solução de lixívia para remover possíveis vestígios de biofilme. Em seguida, a solução era progressivamente removida pela passagem de água previamente esterilizada em autoclave a 121°C durante 20 minutos. A água estéril, que ficava em circulação durante varias horas, permitia remover os vestígios de lixívia; no final, esta água era substituída por nova água estéril.

Para avaliar se a instalação não apresentava contaminação após lavagem eram recolhidas amostras em que se fazia quantificação celular através do corante DAPI.

Ao longo de cada um dos ensaios todo o material e meios eram esterilizados no autoclave (José dos Santos Monteiro Lda, n.º239) a 121°C durante 20 minutos.

2.1.2 Preservação da bactéria

A estirpe bacteriológica foi conservada em meio nutritivo e glicerol a 15% numa câmara refrigerada (SANYO UltraLOW) a $-78\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A reactivação da bactéria foi realizada pela recolha e estriamento de uma pequena amostra em PCA, que era em seguida colocado na estufa (Refrigerated Incubater, Velp Scientifica, mod. FOC225E) a 27°C durante 20 horas.

2.1.3 Meios de Cultura

Ao longo de cada ensaio era necessário preparar meio para o crescimento celular prévio ao arranque do fermentador e também era preparado meio para fornecimento de nutrientes à instalação.

O meio rico em carbono, azoto e fosforo é o ideal para o desenvolvimento da *Pseudomonas fluorescens*. A sua constituição pormenorizada encontra-se no anexo B.

Os nutrientes são fornecidos ao longo de cada ensaio, de forma a obter uma concentração constante ao longo do tempo na célula de fluxo. A concentração dos nutrientes variou de ensaio para ensaio, entre os valores aproximados de 20 ppm e 200 ppm de glucose, enquanto que a razão entre os restantes constituintes do meio foi mantida constante.

Todos os meios foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Os nutrientes eram alimentados ao fermentador recorrendo a uma bomba peristáltica (RS 330-812) a uma caudal de 2 ml/min.

2.2 Métodos Analíticos

2.2.1 Quantificação celular

A microscopia de epifluorescência associada a diferentes corantes permitiu a quantificação celular do biofilme e também a das células em suspensão nos ensaios batch.

Durante este trabalho experimental usaram-se vários fluorocromos para a observação de amostras de biofilme, nomeadamente, os fluorocromos DAPI, CTC e o kit Live/Dead. Os fluorocromos são extremamente susceptíveis à luz branca, o que resulta na sua rápida perda de fluorescência, sendo assim, de forma a evitar a deterioração das amostras, estas foram manuseadas no escuro (Singleton & Sainsbury, 2001).

DAPI

A quantificação do número total de células foi realizada recorrendo ao corante fluorescente *4',6-diamidino-2-phenylindole*, designado também por DAPI. Este penetra pela membrana celular e liga-se fortemente à cadeia dupla de DNA. Sendo assim, independentemente, de as células presentes na amostra serem viáveis ou não, apresentam uma coloração azul quando expostas à radiação ultra-violeta. A quantificação do número total de células foi efectuada utilizando a técnica de microscopia de epifluorescência (Porter et al., 1980).

A realização desta técnica envolveu o procedimento e material descrito no anexo A2.

Coloração Live/Dead

A viabilidade celular dos microrganismos presentes numa determinada amostra foi avaliada utilizando o Kit Live/Dead seguido por observação em microscópio de epifluorescência.

A coloração através do Kit Live/Dead consiste na combinação de dois compostos, nomeadamente, Syto 9 e iodeto de propídio. Estes compostos variam entre si na sua capacidade de penetrar nas membranas de bactérias e também nas suas características de espectro.

O Syto 9 penetra nas membranas celulares e cora todas as células com membrana intacta ou danificada em verde fluorescente enquanto apenas as células com membrana danificada são penetradas pelo iodeto de propídio. A redução do Syto 9 pelo iodeto de propídio atribui as células com membranas danificadas uma coloração vermelha fluorescente, enquanto as células com membranas intactas deverão apresentar uma coloração verde (Boulos et al, 1999).

É importante mencionar que as bactérias que possuam membranas danificadas podem recuperar e reproduzir-se, sendo contudo qualificadas como “mortas” pelo kit. Por outro lado, as bactérias com as membranas intactas podem ser incapazes de adquirir uma coloração verde, não sendo assim classificadas como “vivas”.

A realização desta técnica envolveu o procedimento e material descrito no anexo A2.

CTC

A determinação de microrganismos metabolicamente activos presentes na amostra recolhida foi realizada recorrendo ao corante fluorescente *5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride* (CTC). O CTC é um composto que é reduzido na corrente de transporte de electrões no ciclo respiratório, apresentando-se com coloração vermelha quando analisado ao microscópio de epifluorescência.

Esta técnica permite detectar as bactérias que apresentam uma cadeia respiratória activa, principalmente bactérias Gram-negativas, pois estas apresentarão uma coloração vermelha enquanto as inactivas apresentarão uma coloração verde.

As bactérias presentes na membrana foram examinadas usando um microscópio equipado com um bloco do filtro para a excitação em 510-560 nm e detecção de luz de emissão acima de 590 nm (Coallier et al., 1994).

A realização desta técnica envolveu o procedimento e material descrito no anexo A2.

2.2.2 Determinação da concentração de glucose - DNS

Para determinar a concentração de glucose presente no fermentador e na alimentação ao longo dos ensaios recorreu-se ao método do ácido di-nitrico salicílico (DNS). O reagente de DNS foi preparado de acordo com Miller (1959) e o seu processo de preparação encontra-se descrito no anexo B.

Uma curva de calibração com diferentes padrões de glucose foi preparada e analisada a 540 nm. Os padrões de glucose variaram entre 5 g/L e 0,01 g/L. Idênticos

volumes dos diferentes padrões foram adicionados a tubos de ensaio e em seguida foi adicionado um volume idêntico de DNS, a mistura final foi sujeita ao aquecimento em água a 100°C durante 5 minutos de forma a se desenvolver a coloração desejada, por fim arrefeceu-se as amostras e adicionou-se água destilada. As amostras finais foram analisadas a 540 nm em espectrofotômetro. Construiu-se o gráfico da concentração versus absorvância, para encontrar a curva de calibração de glicose pelo método de DNS (Gonçalves, 1999; Miller, 1959).

Ao longo dos ensaios repetiu-se o método de forma a obter o valor da concentração de glicose para as diferentes amostras.

2.2.3 Determinação da massa do biofilme

A massa do biofilme foi determinada a partir do balanço entre a massa do cupão antes e após a formação do biofilme recorrendo a uma balança analítica (A&D Instruments LTD, mod. T5591).

2.2.4 Determinação da espessura do biofilme

A espessura do biofilme foi determinada recorrendo a um micrómetro. Foram realizadas no mínimo doze medições para cada suporte de biofilme.

2.2.5 Determinação da densidade óptica

A densidade óptica do fermentador foi determinada recorrendo a um espectrofotômetro (PG Instruments Ltd, T80 UV/VIS Spectrometer), realizando a leitura a 610 nm.

2.2.6 Determinação do oxigénio dissolvido

O valor de oxigénio dissolvido no fermentador foi determinado recorrendo a um medidor de oxigénio dissolvido (Durox 325-3, Oxi 340i/SET, 2B30-01179).

2.2.7 Determinação do pH e da temperatura

O pH do afluente do fermentador e dos nutrientes era periodicamente determinado recorrendo a tiras de determinação de pH. A temperatura do fermentador era continuamente verificada utilizando um termómetro de mercúrio.

2.3 Monitorização do sistema

No início de cada ensaio a célula de fluxo e o fermentador foram completamente enchidos com água esterilizada autoclavada a 121°C durante 20

minutos. Em seguida, iniciou-se a transferência de volume do fermentador intermédio para o fermentador principal por gravidade a um caudal de 1 L/h. Ao fim de quatro horas a transferência estava completa e o circuito fechado. A ligação entre o fermentador e a célula de fluxo era interrompido enquanto a concentração em nutrientes no primeiro não fosse a pretendida ao longo do ensaio.

O biofilme desenvolveu-se devido à continua recirculação do fluxo rico em *Pseudomonas fluorescens*. Cada ensaio durou quinze dias, ao longo dos quais foi possível remover amostras para determinar os parâmetros cinéticos de formação do biofilme.

Os testes realizados dizem respeito ao biofilme mas também ao efluente da célula de fluxo e ainda aos nutrientes fornecidos como alimentação.

No que diz respeito ao biofilme determinou-se a sua massa húmida, a sua espessura, o número total de células e o número total de células viáveis e não viáveis. Quanto ao efluente da célula de fluxo determinou-se a sua densidade óptica, a sua concentração de glucose, e ainda o número total de células. A alimentação foi analisada para determinar a sua concentração em glucose de forma a determinar se esta sofreu variação ao longo do tempo por contaminação.

2.3.1 Amostragem de Biofilme

Durante o ensaio para recolher amostras de biofilme, parou-se a circulação na célula de fluxo e fechou-se a entrada da célula com uma pinça de *Hoffman*, e aí removiam-se os cupões que eram em seguida substituídos por outros cupões limpos e previamente esterilizados com álcool etílico a 70%. O suporte de biofilme foi removido recorrendo a um xizato, previamente esterilizado com álcool e flamejado, e foi em seguida colocado numa solução de salina estéril a 0,85%. No caso do biofilme se encontrar muito concentrado, a amostra inicial é diluída. A diluição da amostra consiste na recolha de 1 mL de solução inicial que foi adicionada a 25 mL de solução de salina a 0,85%. A solução de salina foi vigorosamente homogeneizada durante 2 minutos num vortex (Heidolph, mod. 541-10000) regulado para a sua potencia máxima, seguido por 15 minutos no ultra-som (Transsonic π 420, Elmai) de forma a obter-se a melhor dispersão de bactérias de biofilme possível, resultando, assim, numa amostra representativa da constituição celular do biofilme e não agregados celulares.

2.4 Inoculação do Sistema

O processo de inoculação do sistema com a bactéria *Pseudomonas fluorescens* envolveu cinco passos diferentes. O primeiro passo consistiu na inoculação de uma caixa de Petri contendo PCA com uma amostra da bactéria (ATCC 13515) armazenada numa câmara frigorífica a -78°C . Após o crescimento celular em placa, que demorou, aproximadamente, entre 16 e 20 horas, recolheu-se material biológico para a inoculação de um matraz de 100 ml de meio, com uma concentração de glucose igual a 5,5 g/L, de forma a obter uma densidade óptica inicial de 0,05. Quando a DO do matraz de 100 mL atingiu o valor de 1, que demorou, aproximadamente, 10 horas, inoculou-se dois matrizes de 200 ml de meio com uma concentração de glucose igual a 5,5 g/L, de forma a obter-se uma DO inicial de 0,05. O crescimento celular dos matrizes de 200 ml ocorreu *overnight* (demorando aproximadamente 12 horas). Quando o crescimento celular no interior destes matrizes atinge uma DO de 1 recorreu-se a estes para inocular um fermentador intermédio de volume igual a 4 litros de meio, com uma concentração de glucose igual a 2,5 g/L, com um valor de DO inicial igual a 0,05.

Quando o fermentador intermédio atingiu uma DO de 1, iniciou-se o processo de transferência do inóculo para o fermentador principal. A transferência foi realizada a um caudal de 1 L/h. Durante este passo, a solução inicial sofre diluição de 1:2, dado que o fermentador principal encontra-se preenchido com água estéril autoclavada durante 20 minutos a 121°C . O fermentador principal apresenta um volume final de 4 litros.

2.5 Método de Cálculo

O cálculo dos vários parâmetros cinéticos do biofilme foi efectuada em duas fases, recorrendo aos modelos apresentados em 1.6 e 1.7.

Utilizou-se o modelo de desenvolvimento de biofilme (1.6) para obter J_p para diferentes concentrações de substrato e, destes valores, obteve-se μ_{pmax} e K_s do biofilme.

Por outro lado, utilizou-se o modelo de consumo de substrato em estado estacionário (1.7) para obter as constantes cinéticas de reacção ($k_{1/2}$, k_{if} , k_{of}) e a difusividade de substrato no interior do biofilme (D_f).

Os dois tipos de medições efectuadas (crescimento de massa de biofilme e consumo de substrato) permitiram, ainda, calcular $Y_{F/S}$ (taxa de rendimento em biofilme) de acordo com a equação (20).

Nos anexos J e K encontram-se exemplos dos cálculos detalhados.

Capítulo 3_Análise Cinética do desenvolvimento de Biofilme

Este capítulo apresenta os resultados dos ensaios de formação de biofilme obtidos ao longo do projecto na instalação experimental apresentada no capítulo 2. Nestes ensaios analisa-se o impacto de diferentes factores no desenvolvimento do biofilme, nomeadamente, a concentração em nutrientes na célula de fluxo e o regime de escoamento hidráulico.

A informação obtida permite a determinação de parâmetros cinéticos de desenvolvimento do biofilme da *Pseudomonas fluorescens*. Estes parâmetros correspondem aos apresentados nos modelos mencionados no capítulo 1.

3.1 Ensaio de formação de biofilme

3.2 Comparação de Parâmetros cinéticos

3.3 Efeitos de concentração no desenvolvimento de biofilme

3.4 Efeitos de regime de escoamento no desenvolvimento de biofilme

3.5 Conclusões

3.1 Ensaios de formação de biofilme

O objectivo do projecto realizado consistiu na determinação de parâmetros cinéticos de desenvolvimento do biofilme da *Pseudomonas fluorescens* para diferentes concentrações de nutrientes na célula de fluxo, em particular para diferentes concentrações de glucose. Assim, realizaram-se ensaios para concentrações de glucose iguais a, aproximadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm em regime turbulento, a aproximadamente 30°C. No que diz respeito a regime laminar, foram realizados ensaios a concentrações de glucose iguais a, aproximadamente, 20 e 200 ppm, a aproximadamente 30°C.

Os ensaios decorreram em condições idênticas de pH e arejamento. O oxigénio dissolvido no fermentador encontrava-se numa concentração sempre superior a 2,0 mg/L. A superfície de suporte de biofilme era idêntica para todos os ensaios, sendo constituída por PVC.

A tabela seguinte resume todos os ensaios realizados em que os dados obtidos foram reprodutíveis.

Tabela 3.1_Condições operacionais nos diferentes ensaios realizados: concentrações de glucose do efluente da célula de fluxo e regime de escoamento hidráulico aplicado.

Ensaio	Regime	C _{glucose} (ppm)
1	Turbulento (Re=5800)	200
2	Turbulento(Re=5800)	150
3	Turbulento(Re=5800)	80
4	Turbulento(Re=5800)	20
5	Laminar(Re=1700)	200
6	Laminar(Re=1700)	20

Ao longo de cada ensaio recolheu-se, periodicamente, amostras de biofilme da célula de fluxo, e amostras do efluente da célula de fluxo e da alimentação.

3.2 Comparação de Parâmetros cinéticos

Os ensaios realizados ao longo do projecto permitiram obter os parâmetros cinéticos de biofilme da *Pseudomonas fluorescens*, em regime turbulento, em que o agente limitante é a concentração de nutrientes, nomeadamente, de glucose.

A evolução da massa húmida de biofilme obtida ao longo do tempo, para diferentes ensaios, que decorreram com diferentes concentrações de nutrientes na célula de fluxo, mas com iguais números de Reynolds encontra-se representada na

figura 3.1. Estes dados estão envolvidos nos cálculos realizados para determinar os diferentes parâmetros cinéticos do desenvolvimento do biofilme. Exemplos dos cálculos realizados encontram-se no anexo J e K.

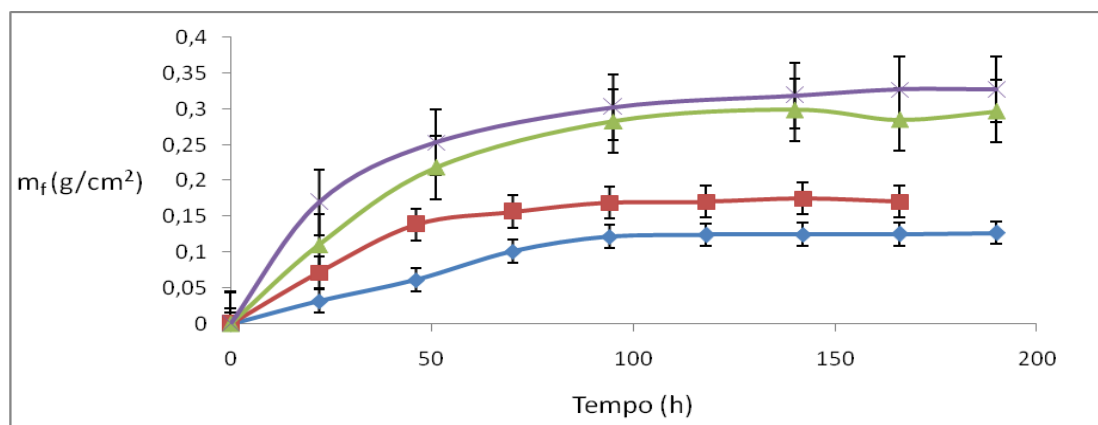


Figura 3.1_Massa de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento ($Re=5800$), para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20 , -80 , -150 , -200 ppm.

A tabela seguinte indica os diferentes parâmetros obtidos, recorrendo ao modelo apresentado no capítulo 1. Os valores obtidos apresentados na tabela 3.2 correspondem a cálculos realizados sobre os dados referentes ao biofilme húmido, pelo que os valores de m_f^∞ e J_p são os valores correspondentes ao biofilme húmido. No caso do parâmetro J_p apresentam-se também os valores baseados na massa seca, calculados tendo em atenção que esta massa corresponde a um valor compreendido entre 1 e 1,5% da massa húmida.

Tabela 3.2_Parâmetros cinéticos obtidos a partir do modelo apresentado no capítulo 1, para o biofilme da *Pseudomonas fluorescens*, para regime turbulento, para diferentes concentrações de glucose no efluente da célula de fluxo.

Ensaio	Re	C_{glucose} (ppm)	$(m_f^\infty)_{\text{húmido}}$ (mg.m^{-2})	$(J_p)_{\text{húmido}}$ ($\text{mg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	J_p ($\text{mg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	μ_p (h^{-1})	$(1/b)*10^{-5}$ (s^{-1})	r_s^* ($\text{mg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
1	5800	200	$3,3*10^6$	21,44	0,214	0,023	1,53	0,124
2	5800	150	$2,9*10^6$	13,89	0,139	0,018	2,15	0,093
3	5800	80	$1,9*10^6$	9,03	0,090	0,017	2,10	0,070
4	5800	20	$1,2*10^6$	4,00	0,040	0,012	3,12	0,047

Pela análise dos valores obtidos para os parâmetros cinéticos é evidente que, com o aumento da concentração de nutrientes na célula de fluxo, ocorre um

aumento do valor de J_p (fluxo de formação de biofilme), r_s^* (taxa de consumo de substrato), e ainda μ_p (taxa específica de crescimento de biofilme).

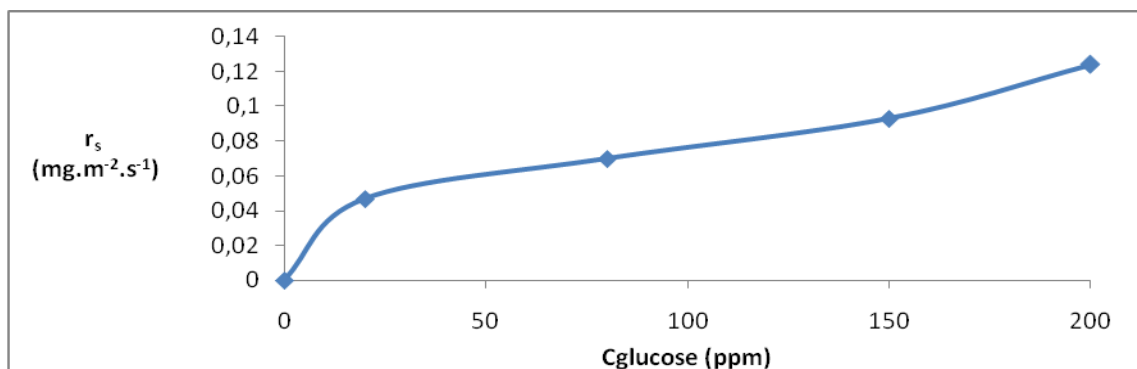


Figura 3.2_Taxa de consumo de substrato por unidade de área de biofilme (r_s^*), para quatro diferentes concentrações em glicose na célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm, para regime turbulento ($Re=5800$).

Com o aumento da concentração de nutrientes na célula de fluxo ocorre uma maior disponibilidade de nutrientes na camada activa do biofilme, que permite uma maior proliferação celular. Tal resulta em valores mais elevados de J_p e μ_p . A proliferação celular leva ao aumento do consumo de nutrientes pela camada activa do biofilme, resultando num valor de r_s^* superior para maiores concentrações de nutrientes no efluente da célula de fluxo.

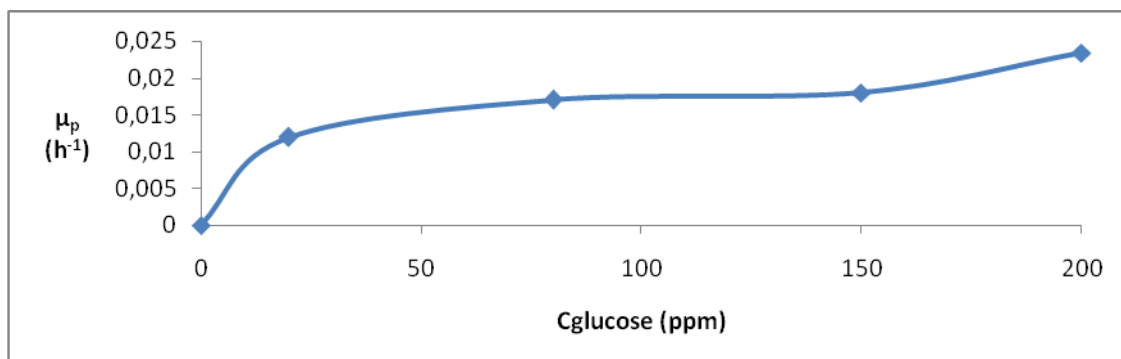


Figura 3.3_Taxa específica de crescimento de biofilme (μ_p), para quatro diferentes concentrações em glicose do efluente da célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm, para regime turbulento ($Re=5800$).

Quanto ao valor de $1/b$, este diminui com o aumento da concentração de nutrientes na célula de fluxo. Este parâmetro corresponde à resistência que o biofilme apresenta ao desprendimento; sendo assim, quanto maior a espessura do biofilme mais susceptível será este às tensões de corte a que se encontra exposto, logo, menor o valor de $1/b$. Assim, é esperado que com o aumento da espessura de biofilme, que se deve ao aumento da concentração de nutriente, ocorra a diminuição do valor de $1/b$. É importante mencionar que os valores de $1/b$ para os ensaios a 80 ppm e 150 ppm são semelhantes, o que pode ter a ver com imprecisões

experimentais ou com alterações pouco significativas na estrutura do biofilme nessa gama de concentrações.

No que diz respeito ao parâmetro cinético $Y_{F/S}$ (taxa de rendimento em biomassa), obteve-se 1,10 para uma concentração igual a 200 ppm, 0,59 para 150 ppm, 0,57 para 80 ppm e ainda 1,5 para 20 ppm. Os valores obtidos para as concentrações de 200 e 20 ppm são superiores a 1. A taxa de rendimento em biomassa foi calculada em função da concentração de glucose. Dado que a alimentação apresentava também outros compostos fornecedores de carbono orgânico, como a peptona e o extracto de levedura, tal poderá explicar que dois dos valores de $Y_{F/S}$ sejam superiores a 1. Outro factor que pode facilmente afectar este parâmetro é a espessura do biofilme. A taxa de rendimento em biomassa é calculada recorrendo à equação (20), pelo que uma pequena variação no valor de espessura de biofilme (L_f) ou no valor de r_s pode afectar, consideravelmente, o valor final de $Y_{F/S}$. Assim, a reprodutibilidade destes valores é reduzida. No entanto, os valores $Y_{F/S}$ apresentados por Ghose et al (1979) iguais a 0,38 para glucose, e 0,49 para etanol, encontram-se na mesma gama que os valores de $Y_{F/S}$ obtidos para as concentrações de glucose iguais a 80 e 150 ppm.

Foram também estimados os parâmetros cinéticos K_s e μ_{pmax} recorrendo ao software *curve expert 1.3*.

O parâmetro K_s corresponde à **constante de afinidade dos microrganismos para o substrato, dentro do biofilme**. Quanto maior o valor de K_s , menor a afinidade dos microrganismos para o substrato. O valor de K_s obtido foi $19,98 \cdot 10^{-3} \text{ kg.m}^{-3}$.

O parâmetro μ_{pmax} corresponde ao **valor máximo da taxa específica de produção de biofilme**. O valor de μ_{pmax} obtido foi $0,023 \text{ h}^{-1}$. Os valores de μ_{pmax} para culturas em suspensão, em que o nutriente limitante é a glucose, apresentados em bibliografia, são consideravelmente superiores. Por exemplo, para *E.coli*, o valor de μ_{pmax} está compreendido entre $0,8$ e $1,4 \text{ h}^{-1}$, e para a *A. Aerogenes*, o valor de μ_{pmax} está estimado como 1,22 (Blanch et al, 1997). Chrzanowskii e Grover (2008) obtiveram, em quimiostato, o valor de μ_{pmax} de $0,43 \text{ h}^{-1}$ para uma estirpe de *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 3214). Estudos, como os de Manuel et al (2005), apresentam o μ_{pmax} de biofilme formado para água potável dez vezes inferior ao obtido para a cultura em suspensão. Assim, conclui-se que a produção de biomassa fixa é mais lenta do que em suspensão, o que corrobora as conclusões que têm sido obtidas através de estudos de Biologia Molecular que revelaram diferenças fenotípicas importantes entre células aderidas e células planctónicas (Costerton, 1999).

Estimou-se, também, a **difusividade da glucose no biofilme (D_f)** e ainda o valor da **constante de velocidade da reacção de ordem 1 (k_{1f})**. Estes dois parâmetros foram calculados, considerando que, para uma concentração de glucose igual a 20 ppm, a reacção era de ordem 1. Assim, a difusividade da glucose estimada correspondeu a $2,01 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, e o valor de k_{1f} , correspondeu a $0,045 \text{ s}^{-1}$. O valor de D_f obtido corresponde a, aproximadamente, 20% do valor da difusividade da glucose na água, para as mesmas condições operacionais. Em suma:

μ_{pmax} (biofilme)	K_s (biofilme)	$Y_{F/S}$ (biofilme)	$k_{1/2}$ (biofilme)	K_{0f} (biofilme)	k_{1f} (biofilme)	D_f (biofilme)
$0,023 \text{ h}^{-1}$	$0,02 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$	0,57-1,5	$2,62 \cdot 10^{-7} \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{m}^{-1/2} \cdot \text{s}^{-1}$	$1,71 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$	$0,045 \text{ s}^{-1}$	$2,01 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

3.3 Efeitos da concentração de nutrientes na célula de fluxo no desenvolvimento de biofilme

Ao longo do projecto foi avaliado o impacto da concentração de nutrientes fornecidos pela alimentação ao sistema em diferentes parâmetros do desenvolvimento do biofilme, nomeadamente, a massa e a espessura do biofilme, e também o número total de células por unidade de área de biofilme. Assim, diariamente, eram recolhidas amostras que eram sujeitas aos métodos analíticos mencionados anteriormente no capítulo 2.

É importante mencionar que as curvas apresentadas na figura 3.1 não contêm todos os pontos obtidos em cada um dos ensaios. Devido á interferência de problemas operacionais na remoção das amostras (cupões) nos ensaios com biofilme foi necessário rejeitar alguns pontos de forma a eliminar tais interferências na análise dos dados obtidos. No anexo G encontra-se uma das curvas apresentadas (200 ppm), mas sem rejeição de pontos.

A evolução da massa húmida de biofilme obtida ao longo do tempo, para diferentes ensaios, que decorreram com diferentes concentrações de nutrientes na célula de fluxo, mas com iguais números de Reynolds encontra-se representada na figura 3.1.

Verifica-se que o aumento da concentração de nutrientes, sob a forma de carbono facilmente assimilável disponível na célula de fluxo conduz a maior acumulação de biofilme nas superfícies de adesão. Os resultados obtidos estão de acordo com os apresentados em outros estudos como em *Frias et al.* (2001). Este

aumento na massa de biofilme húmido deve-se ao aumento do número de células presentes no biofilme devido ao maior crescimento microbiológico, sendo este mais acentuado na presença de elevadas concentrações de carbono facilmente assimilável. É importante mencionar que a biomassa é também constituída por material polimérico, sendo a formação deste também afectada pela concentração de nutrientes, mas não de uma forma tão evidente como na multiplicação celular.

Pela análise da figura 3.1, verifica-se que, de um modo geral, as curvas de acumulação de biofilme apresentam comportamentos semelhantes ao longo do tempo para efluentes a diferentes concentrações, verificando-se, inclusivé, que para concentrações superiores o valor de biomassa é sempre maior em todos os pontos em relação a concentrações menores.

Verificou-se também que o desprendimento ocorre mais rapidamente para concentrações em glucose mais elevadas. Dado que biofilmes mais espessos apresentam zonas mais frágeis, ou seja, quanto maior a biomassa maior o número de zonas frágeis, logo maior a probabilidade de desprendimento. Tal verificou-se nos ensaios a 200 e 150 ppm de concentração de glucose.

O período de tempo que o biofilme demora a atingir o estado estacionário é também influenciado pela concentração em nutrientes na célula de fluxo; no entanto, não foi possível estabelecer uma relação entre os dois parâmetros.

A espessura do biofilme foi outros dos parâmetros estudados, sendo realizadas doze medições ao longo de cada suporte de biofilme de forma a obter um valor médio representativo. A figura 3.4 apresenta a evolução da espessura do biofilme húmido ao longo do tempo para diferentes concentrações de nutrientes na célula de fluxo.

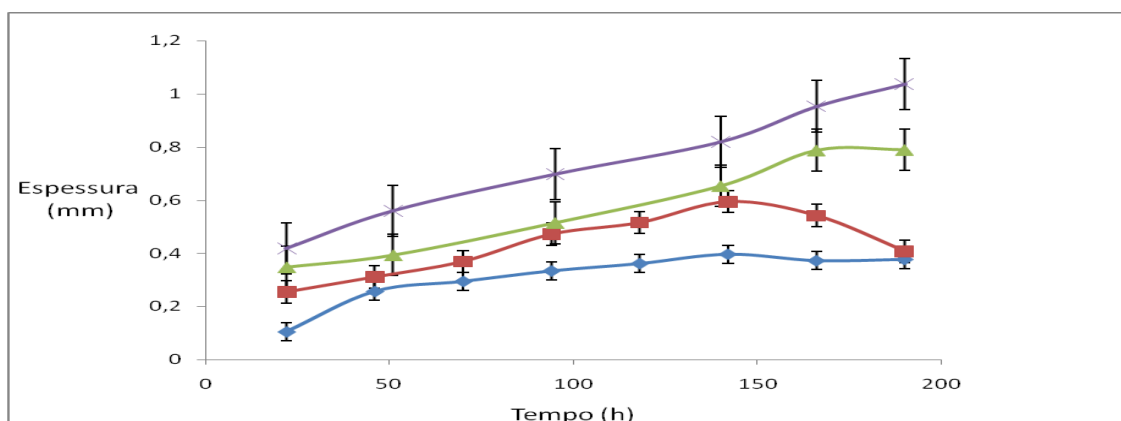


Figura 3.4_Espessura do biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento ($Re=5800$), para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, 20, 80, 150, 200 ppm.

Pela análise dos resultados obtidos, representados na figura 3.4, conclui-se que com o aumento da concentração de glucose na célula de fluxo a espessura aumenta. Os dados deste parâmetro e da massa do biofilme húmido, permitem concluir que a concentração de glucose na célula de fluxo actua como um agente limitante à proliferação do biofilme.

Os métodos de quantificação celular oferecem também informação no que diz respeito ao desenvolvimento do biofilme.

Ao longo de cada um dos ensaios, de forma a avaliar a evolução do número total de células presentes no biofilme, aplicou-se o método DAPI, que cora de azul todas as células presentes na amostra independentemente de estas se encontrarem vivas ou mortas. Em anexo (H) apresenta-se uma imagem, obtida por microscópio óptico, após coloração com DAPI, de uma amostra de biofilme recolhida para o ensaio em que a concentração em nutrientes do efluente da célula é igual a 200ppm.

O gráfico seguinte apresenta a quantificação celular do biofilme ao longo do tempo para as diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo.

Depois de analisar os vários ensaios realizados verifica-se que a adesão celular é um processo muito rápido. Também é evidente que o número total de células nas amostras de biofilme aumenta, consideravelmente, dos ensaios em que se encontra uma menor concentração de glucose na célula de fluxo para os com maior concentração.

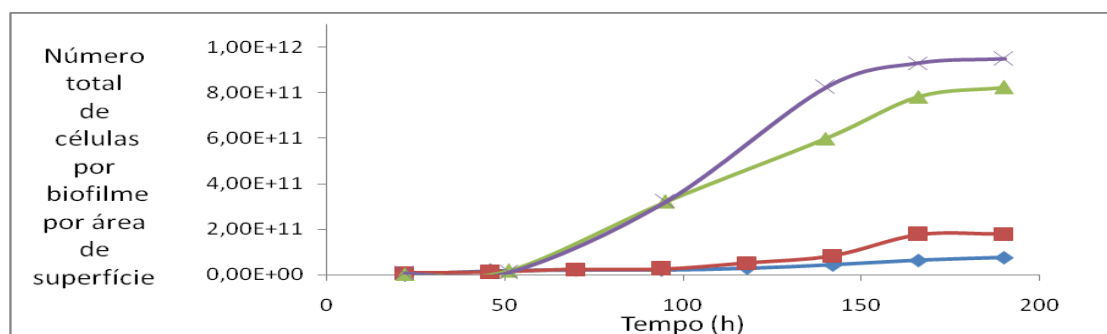


Figura 3.5_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, 20, 80, 150, 200 ppm, obtido para o método de DAPI.

A análise dos diferentes ensaios demonstrou o mesmo comportamento típico para as diferentes curvas, independentemente da concentração estabelecida no fermentador. Como se pode visualizar pela figura 3.5, para os diferentes ensaios o número total de células inicial não cresce à mesma velocidade nas primeiras 48 horas em relação ao resto da experiência sendo o aumento mais acentuado a partir das 50 horas, ocorrendo um ponto de sela em todos os gráficos para as diferentes concentrações de nutrientes. Este comportamento é justificado pelo facto de que no

início do processo de formação de biofilme, nomeadamente no fim da fase de adesão e no início da fase de maturação, o esforço celular está concentrado na produção de exopolissacárideos (que interagem com os materiais da superfície e permitem a melhor adesão celular) e não na multiplicação celular. Após o que se considera a intensa produção de *EPS*, denota-se nos gráficos um crescimento celular evidente, pois nesta altura o biofilme encontra-se, verdadeiramente, na fase de maturação. Estudos realizados na avaliação da produção de *EPS* pelas *Pseudomonas fluorescens* em biofilme apresentam a intensiva produção deste material polimérico no início dos ensaios e o seu linear decréscimo ao longo da experiência. Este decréscimo é acompanhado pelo aumento de material proteico, que indicia o início da multiplicação celular e, conseqüentemente, o início da fase de maturação do biofilme (Lopes, 2000).

Outra das formas de quantificação celular utilizada foi o kit Live/Dead. Este método permite a identificação das bactérias viáveis, corando as de verde, e as não viáveis corando as de vermelho. O kit era aplicado a cada amostra de biofilme recolhida de forma a avaliar a evolução do número total de células vivas e mortas ao longo de cada ensaio. Em anexo (H) apresenta-se uma imagem, obtida por microscópio óptico, após coloração com o kit Live/Dead de uma amostra de biofilme, recolhida para o ensaio em que a concentração em nutrientes na célula de fluxo é igual a 200 ppm.

O gráfico seguinte apresenta o número total de células(vivas e mortas) coradas pelo kit Live/Dead ao longo do tempo, para as diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo.

Como se pode verificar, os resultados obtidos através deste método apresentam um comportamento semelhante ao apresentados pelos resultados obtidos para o DAPI, inclusivé no ponto de sela mencionado anteriormente, o que corrobora o suposto atrás.

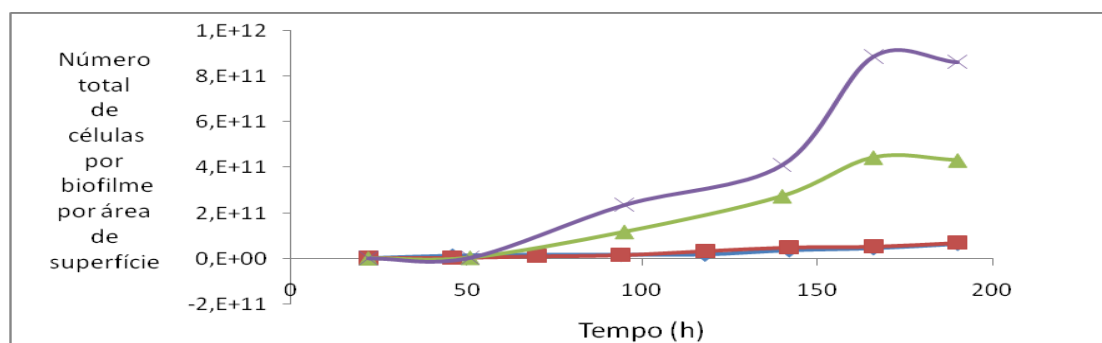


Figura 3.6_ Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método do kit Live/Dead.

Quando comparando o valor de células totais coradas pelo DAPI com o valor de células totais (mortas e vivas) coradas pelo kit Live/Dead é evidente que o valor obtido aquando da utilização do DAPI é sempre, consideravelmente, superior ao obtido para o kit do Live/Dead. Normalmente, o erro é constante ao longo do ensaio, aumentando nos ensaios com maior valor de células totais. Esta discrepância entre os valores obtidos para cada uma das técnicas é também mencionado em outros estudos. Estudos como o apresentado por Boulos et al. (1999) apresentam como justificação, para um número inferior de células totais detectadas pelo Kit Live/Dead em relação ao obtido com o DAPI, o facto de que o kit apresenta uma diminuição da sua eficiência quando as células da amostra se encontram sob *stress* ambiental. O kit L/D parece também ser mais susceptível à luz do que o corante DAPI, o que leva à sua mais rápida perda de fluorescência, contribuindo para a discrepância entre os resultados obtidos para cada um dos corantes.

Dado que o método do Kit L/D permite avaliar as células vivas e as mortas separadamente, a representação gráfica dos parâmetros em separado é elucidativa. O gráfico seguinte apresenta o número total de células vivas coradas pelo kit Live/Dead ao longo do tempo para as diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo.

Após a avaliação dos resultados obtidos para os diferentes ensaios, comparando o gráfico da figura 3.6 com o da figura 3.7, conclui-se que na primeira amostra recolhida de biofilme o número de células vivas corresponde, aproximadamente, à totalidade das células coradas pelo kit Live/Dead. Ao longo da experiência o número de células mortas identificadas aumenta consideravelmente, como se pode verificar pelo gráfico da figura 3.8.

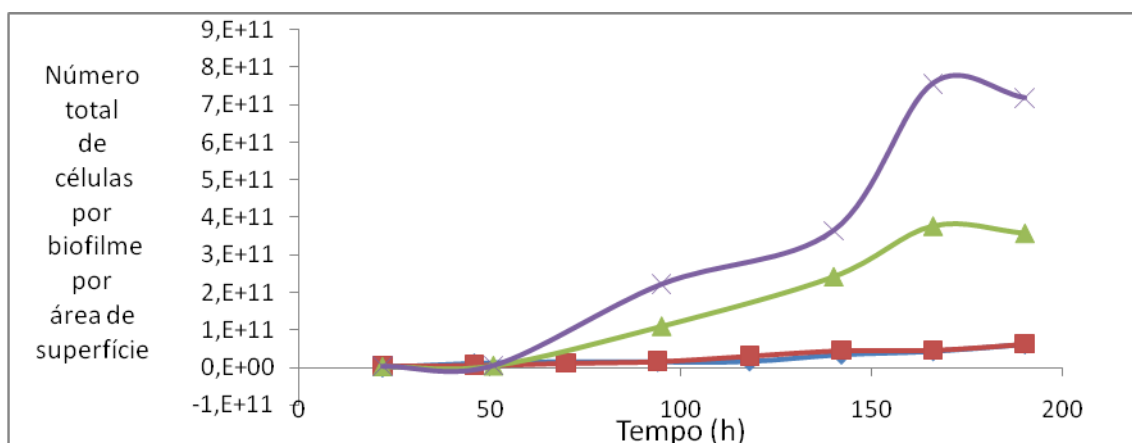


Figura 3.7_Número total de células vivas presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método do kit Live/Dead.

Para maiores espessuras do biofilme, correspondentes a maiores concentrações de nutrientes na célula de fluxo, nos últimos dias dos ensaios, a razão entre o valor de células mortas e células vivas é consideravelmente maior. Tal deve-se à maior dificuldade de penetração do substrato no biofilme, o que leva à destruição das células mais afastadas da superfície (camada inactiva). Sendo assim, pode-se concluir que a penetração do substrato é parcial e não total, o que leva a uma camada activa constante e uma camada inactiva que aumenta ao longo do tempo. A penetração parcial resulta num aumento de células não viáveis nos últimos dias dos ensaios como se pode verificar pelo gráfico seguinte.

O gráfico seguinte apresenta o número total de células mortas coradas pelo kit L/D ao longo do tempo para as várias concentrações de glucose na célula de fluxo.

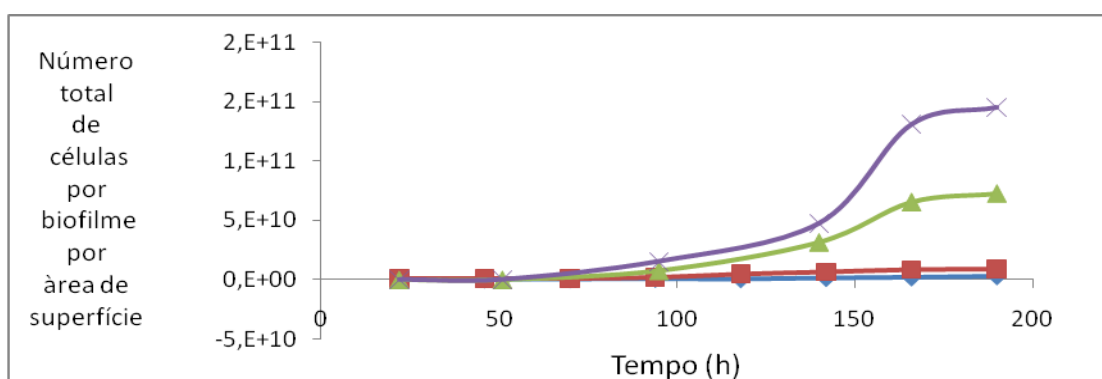


Figura 3.8_Número total de células mortas presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm, obtido para o método de Live/Dead.

Outros dos métodos de quantificação celular utilizado foi o CTC. Este método permite detectar as bactérias que possuem uma cadeia respiratória activa, principalmente bactérias gram-negativas, que apresentarão uma coloração vermelha, enquanto as inactivas apresentarão uma coloração verde. No entanto, este método não apresentou resultados reprodutíveis sendo por fim rejeitado. Deduz-se que esta situação se deva à deterioração do reagente utilizado.

Um dos parâmetros complementares que foi estudado ao longo dos ensaios foi a densidade óptica do fermentador. Tal permitiu verificar como a cultura em suspensão se estava a comportar. O gráfico seguinte apresenta os dados da densidade óptica para cada um dos ensaios ao longo do tempo, em regime turbulento, para as diferentes concentrações de nutrientes na célula de fluxo.

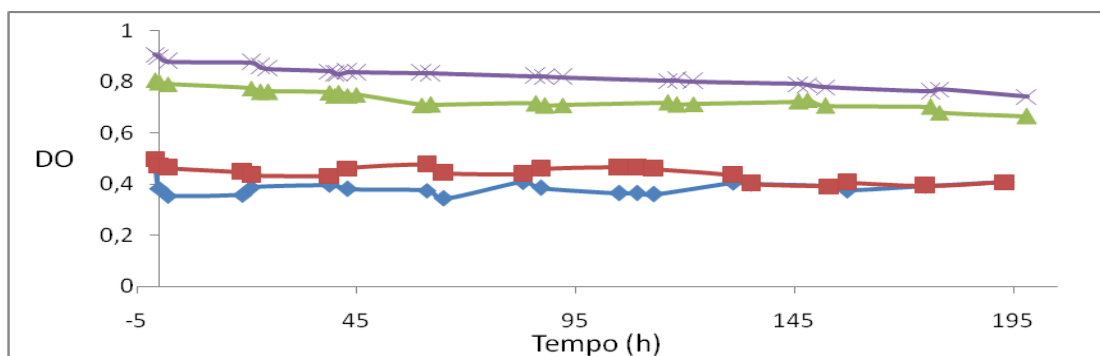


Figura 3.9_Densidade óptica (DO) no fermentador ao longo do tempo, em regime turbulento, para quatro diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20, -80, -150, -200 ppm.

Ao longo de cada um dos ensaios o valor da densidade óptica é, aproximadamente, constante ao longo da experiência, diminuindo ligeiramente nos últimos dias. O facto de o valor da DO ser, continuamente, abaixo de 1, resulta do inóculo no fermentador principal estar constantemente a ser diluído pela alimentação, que apresenta um caudal de 2 ml/min. A ligeira diminuição da DO, nos últimos dias dos ensaios, deve-se à fragilização da cultura bacteriológica.

Semelhantemente ao que acontece com o número de células presentes no biofilme, também o número de células em suspensão aumenta com o aumento de concentração dos nutrientes, como se pode verificar pelos valores da densidade óptica. Esta semelhança de comportamento corrobora o concluído, anteriormente, que o substrato orgânico (e não o oxigénio) é, no presente estudo, o agente limitante tanto no desenvolvimento celular no biofilme como também na multiplicação celular em suspensão.

3.4 Efeitos do regime de escoamento no desenvolvimento do biofilme

O regime de escoamento é também um factor que afecta a massa, estrutura e espessura do biofilme húmido. A velocidade de escoamento na célula de fluxo é um dos parâmetros chave para o estudo da adesão de microrganismos à superfícies. A velocidade de escoamento condiciona a capacidade de adesão dos microrganismos, assim como dita a estrutura do biofilme.

O gráfico seguinte apresenta a evolução da biomassa húmida ao longo do tempo, para ensaios a iguais concentrações de nutrientes na célula de fluxo, mas a regimes de escoamento diferentes, nomeadamente, laminar e turbulento. O estudo destas curvas permite avaliar o impacto do regime de escoamento no desenvolvimento do biofilme. O comportamento das curvas, para concentrações de

nutrientes na célula de fluxo igual a 200 ppm, tanto em regime laminar como em regime turbulento, é semelhante. No entanto, é importante mencionar que em regime laminar se atinge valores de massa ligeiramente superiores. Outro pormenor também relevante é que, dado o carácter filamentososo do biofilme em regime laminar, este se solta com maior facilidade aquando da remoção de cupões, para recolha de amostras. Quanto às curvas para 20 ppm de concentração de glucose, deduz-se que a comparação entre os diferentes regimes é também semelhante.

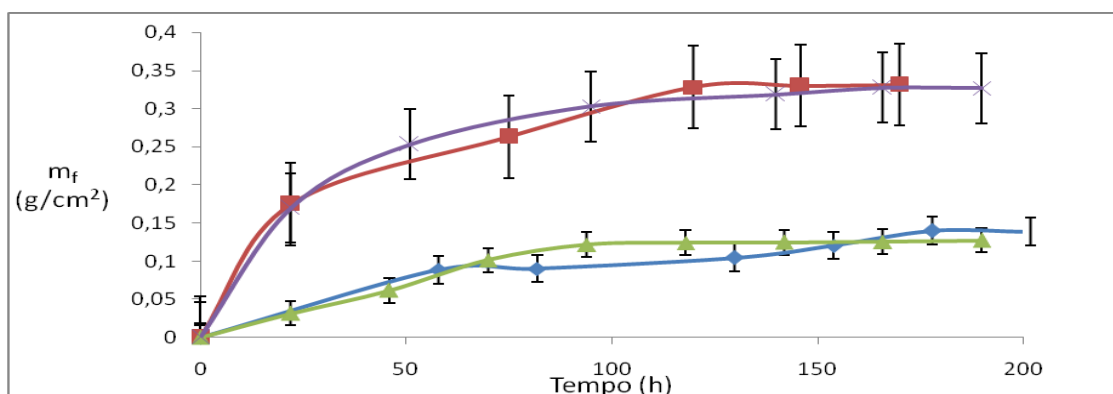


Figura 3.10_Massa de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento e laminar, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, 20 ppm em regime laminar, 200 ppm em regime laminar, 20 ppm em regime turbulento, 200 ppm em regime turbulento.

A espessura é outro parâmetro que também é influenciado pelo regime de escoamento em vigor. O gráfico seguinte apresenta a evolução da espessura do biofilme húmido para ensaios a iguais concentrações de nutrientes na célula de fluxo, mas a regimes diferentes, nomeadamente, laminar e turbulento.

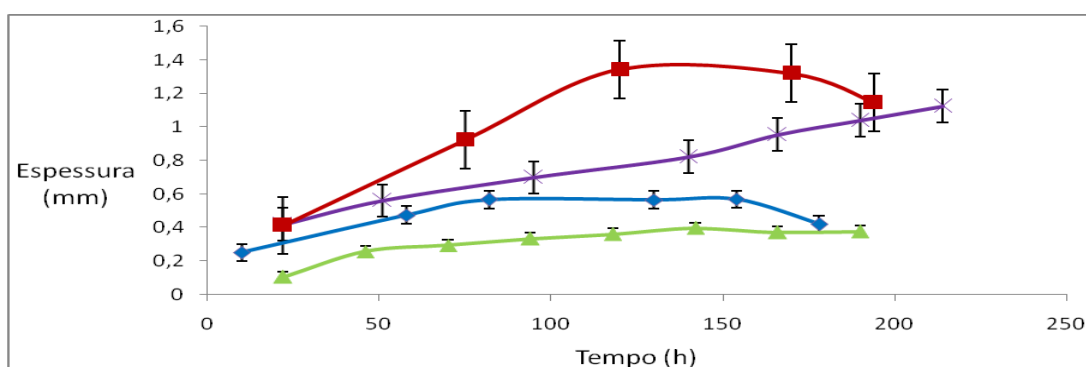


Figura 3.11_Espessura de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento e laminar, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, 20 ppm em regime laminar, 200 ppm em regime laminar, 20 ppm em regime turbulento, 200 ppm em regime turbulento.

Comparando as diferentes curvas, que ocorreram à mesma concentração de nutrientes, mas em diferentes regimes de escoamento, pode-se concluir que as espessuras em regime laminar são ligeiramente superiores às espessuras obtidas nas mesmas condições mas em regime turbulento. O regime turbulento limita mais a proliferação do biofilme devido às altas tensões de corte a que se encontra exposto, originando uma estrutura mais compacta, coesa e resistente, enquanto que o biofilme em regime laminar apresenta-se mais espesso e mais heterogêneo. O desenvolvimento do biofilme em regime laminar é mais caótico e filamentoso resultando numa maior espessura média.

O regime de escoamento também provoca mudanças de comportamento no que diz respeito à quantificação celular no biofilme. As curvas apresentadas no gráfico seguinte representam o número total de células (coradas por DAPI) por unidade de área de biofilme, para ensaios a iguais concentrações de nutrientes na célula de fluxo, mas a diferentes regimes de escoamento.

Pela análise das curvas na figura 3.12, verifica-se que quanto mais turbulento for o regime de escoamento imposto, mais rápido é o aumento inicial do número total de células presentes nos biofilmes formados. No entanto, verifica-se que existe nos últimos dias de experiência um maior valor de células totais por biofilme, em regime laminar, em relação aos valores obtidos para as mesmas condições mas, em regime turbulento. É importante mencionar que existem pontos que apresentaram um comportamento contrário ao mencionado antes, mas dado o seu número reduzido não foram considerados aquando da análise dos dados.

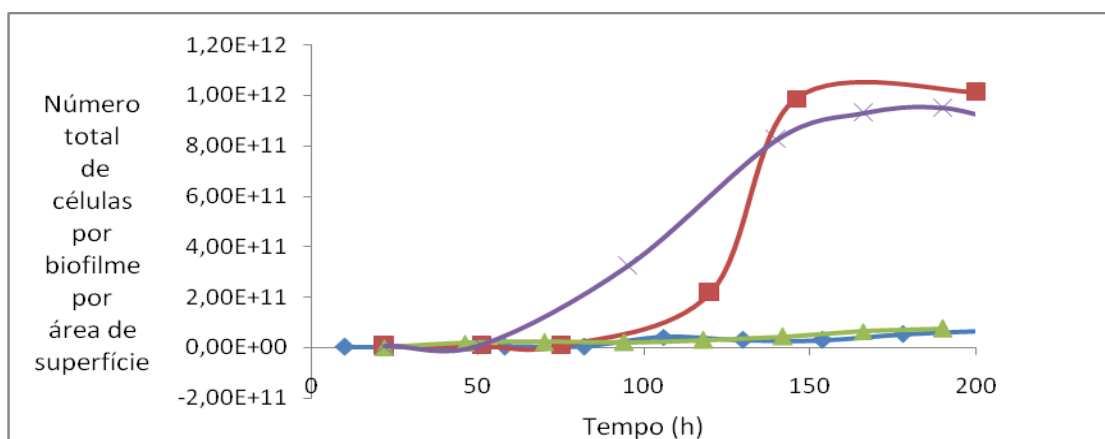


Figura 3.12_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime laminar e turbulento, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, -20 ppm em regime laminar, -200 ppm em regime laminar, -20 ppm em regime turbulento, -200 ppm em regime turbulento, obtido para o método de DAPI.

Durante a evolução do biofilme em regime turbulento, como resposta à maior tensão de corte, o biofilme produz uma concentração de *EPS* superior ao que acontece nas mesmas condições em regime laminar. Desta forma, ocorre o fortalecimento da adesão, o que evita o desprendimento. Como em regime laminar as condições são menos adversas, a produção de *EPS* diminui, enquanto que a produção celular aumenta em relação ao regime turbulento. Assim, é explicado o comportamento apresentado pelas curvas da figura 3.12.

Comparando os valores obtidos na quantificação celular através do kit L/D para ensaios em regimes de escoamento laminar e turbulento apresentados na figura 3.13, verifica-se o concluído anteriormente: para a mesma concentração de nutrientes na célula de fluxo, o biofilme formado em regime laminar apresenta um maior número total de células do que o formado em regime turbulento.

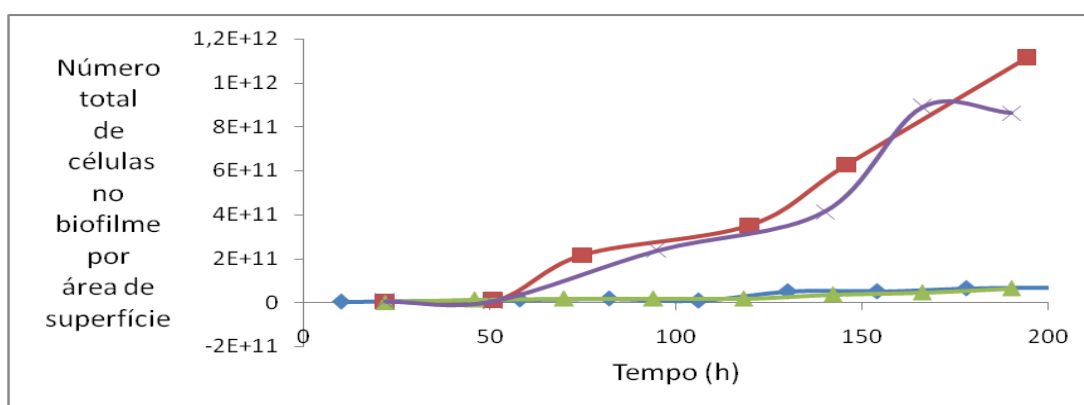


Figura 3.13_Número total de células presentes no biofilme por unidade de área, ao longo do tempo, em regime laminar e turbulento, para duas diferentes concentrações em nutrientes, nomeadamente, **–20 ppm em regime laminar**, **–200 ppm em regime laminar**, **–20 ppm em regime turbulento**, **–200 ppm em regime turbulento**, obtido para o método de kit Live/Dead.

3.5. Conclusões

O trabalho realizado tinha como objectivo a determinação de parâmetros cinéticos do desenvolvimento do biofilme, de acordo com os modelos apresentado no capítulo 1, para *Pseudomonas fluorescens*. Os parâmetros obtidos apresentavam como agente limitante a concentração em nutrientes na célula de fluxo. A cinética foi estudada para quatro concentrações diferentes, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm em regime turbulento. Em paralelo, foram estudados outros factores do desenvolvimento do biofilme que permitiram recolher informação sobre o carácter do mesmo. A quantificação celular através do kit Live/Dead permitiu determinar o carácter da penetração de substrato, que foi classificada como parcial.

Capítulo 4_Avaliação do trabalho realizado

Neste capítulo apresenta-se o resumo do trabalho realizado ao longo do projecto, incluindo os objectivos iniciais propostos, e o grau de sucesso na realização dos mesmos. Esta secção apresenta também as limitações do projecto realizado e as diferentes possibilidades de prolongamento do mesmo, apontando as futuras possibilidades de extensão e melhoramento do trabalho realizado.

4.1 Objectivos realizados

O projecto tinha como objectivo principal a determinação de parâmetros cinéticos dos modelos de desenvolvimento de biofilme e de consumo de substrato para a *Pseudomonas fluorescens*, para diferentes concentrações de nutrientes na célula de fluxo. Em paralelo eram avaliados outros parâmetros no que diz respeito ao desenvolvimento de biofilme, nomeadamente, o impacto do regime de escoamento hidráulico no mesmo, e a determinação da quantificação celular do biofilme para os diferentes ensaios, por diferentes métodos.

Quanto aos parâmetros cinéticos, foram realizados vários ensaios para a determinação dos primeiros, e após a conclusão do projecto, foi possível obter os parâmetros cinéticos em função de quatro diferentes concentrações em nutrientes na célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, e 200 ppm, em regime turbulento.

O projecto permitiu também obter alguma informação adicional sobre o desenvolvimento do biofilme por *Pseudomonas fluorescens*.

4.2. Limitações e trabalho futuro

Uma das críticas a ser apontada ao trabalho realizado é que, dado o período de tempo que demora cada ensaio e a susceptibilidade da área em questão, o número de ensaios que apresentam resultados viáveis é bastante reduzido. Assim, um dos factores a melhorar seria o número de ensaios realizados. Em especial, repetir os ensaios para as mesmas concentrações, de forma a determinar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

Outra das limitações do trabalho é que só foi possível analisar um agente limitante, nomeadamente, a concentração de nutrientes. Como trabalho futuro seria interessante estudar influência de outros agentes limitantes na cinética do biofilme, como por exemplo, o oxigénio dissolvido.

Ao longo do projecto, o material de superfície de adesão utilizada foi sempre o mesmo, seria interessante no trabalho futuro, a utilização de diferentes materiais como superfície de adesão e comparar o seu efeito no desenvolvimento de biofilme.

Após a conclusão do projecto, considera-se que será também interessante o estudo da cinética de uma amostra mista de microrganismos e comparar os resultados obtidos com os de uma cultura pura. Seria também relevante a determinação de parâmetros cinéticos a diferentes temperaturas.

BIBLIOGRAFIA

Bailey, J.E., Ollis, D.F. *Biochemical Engineering Fundamental*. 2nd Edition. McGraw-Hill Chemical Engineering Series, 1986.

Blanch H. W., Clark D. S. *Biochemical Engineering*. 1st Edition. CRC; p.187, 1997

Bott, T.R. *Aspects of Biofilm Formation and Destruction*. Corrosion Reviews; 11:1-24, 1993.

Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., Desjardins, R. *LIVE/DEAD, BacLight, application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water*. Journal of microbiological method; 37:77-86.

Charackis, W.G., Marshall, K. C. *Biofilms: A Basis for an Interdisciplinary Approach*. Jonh Wiley and Sons, Inc, Nova Iorque; 7-10, 1990.

Chrzanowski, T.H., Grover, J.P., *Element content of Pseudomonas fluorescens varies with growth rate and temperature: A replicated chemostat study addressing ecological stoichiometry*. Limnol. Oceanogr.; 53(4), 1242-1251, 2008.

Coallier, J., Prévost, M., Rompré, A. *The optimization and application of two direct viable count methods for bacteria in distributed drinking water*. Can. J. Microbiol; 40:830-836, 1994.

Costerton, J.W. *Introduction to Biofilm*. International Journal of Antimicrobial Agents; 11:217-221, 1999.

Fleming, H.C., Schaule, G., McDonog, R., Ridgway, H.F. *Effects and Extent of Biofilm Accumulation in Membrane systems*. Biofouling and Biocorrosion in Industrial Water Systems; 63-90, 1991.

Frias, J.; Ribas, F., Lucena, F. *Effects of Different Nutrients on Bacterial Growth in a Pilot Distribution System*. Anton Leeuw Int. J. G.; 80:129-138, 2001.

Ghose, T. K., Fiecher, A., Blakebrough, N., *Mass and Energy balances for Microbial Growth Kinetics*, Advances in Biochemical Engineering, vol 11, Springer-Verlag, pp. 53, New York, 1979.

Gonçalves, M. L. S. *Métodos Instrumentais para análises de soluções - Análise Quantitativa*. 3rd edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1996.

Harremöes, P. *Biofilm Kinetics*. Water Pollution Microbiology, Vol. 2, edited by Mitchell, R, pp. 82-109, John Wiley and Sons, New York, 1987.

Lopes, F. A., Vieira, M. J., Melo, L. F. *Chemical composition and activity of a biofilm during the start-up of an airlift reactor*. Water Science and Technology; 41:105-11, 2000.

Lopes, F. A., Vieira, M. J., Melo, L. F. *Kinetic Parameters and Mass Transfer Coefficients in Pseudomonas fluorescens Biofilms*. 2nd European Symposium on Biochemical Engineering Science, Porto, 1998.

Manuel, C. M., Nunes, O. C., Melo, L. F. *Dynamics of drinking water in flow/non-flow conditions*. Water Research; **41**:551-562, 2007.

Melo, L. F. *Biofilmes e Controlo da Poluição*. Boletim de Biotecnologia; **48**:16-25, 1994.

Melo, L. F., Bott, T.R., Fletcher, M., Capdeville, B. *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992.

L.F. Melo, R. Oliveira, *Biofilm Reactors*. Multiphase Bioreactor Design, edited by J. Cabral, M. Mota, J. Tramper, pp. 271-308, Taylor & Francis, London, 2001.

Melo, L.F., Vieira, M.J. *Physical stability and biological activity of biofilms under turbulent flow and low substrate concentration*. Bioprocess Engineering; **20**:369-375, 1999.

Miller, G. L. *Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar*. Analytical Chemistry; **31**:3, 462-428.

Nivens, D. E., Palmer J., White, D. C. *Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: a review of analytical techniques*. Journal of industrial Microbiology; **15**:263-276, 1995.

Pereira, M. A.; Alves, A. A.; Azevedo, J.; Mota, M. And Oliveira, R. *Influence of Fisico-chemical Properties of Porous Microcarriers on the Adhesion of a Anaerobic Consortium*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology; **24**:181-186, 2000.

Pereira, M. O., Morin, P, Vieira, M. J., Melo, L. F. *A versatile reactor for continuous monitoring of biofilm properties in laboratory and industrial conditions*. Letters in Applied Microbiology; **34**:22-26, 2002.

Porter, K.G., Freig, Y.S. *The use of DAPI for identification and counting of aquatic microflora*. *Limnol. Oceanography*; **25**:943-948, 1980.

Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. *Microbiology*. 4th edition. WCB McGraw-Hill, Boston, 1999.

Singleton, P., Sainsbury, D. *Dictionary of microbiology and molecular biology*, 3rd edition. John Wiley, Chichester, 2001.

Stanier, R. Y., Ingraham, J. L. *General Microbiology*. 5th edition. MacMillan Press, Londres; 200-225, 1995.

Vieira, M. J., Melo, L. F., Pinheiro, M. M. *Biofilm Formation Hydrodynamic Effects on Internal Diffusion and Structure*. Biofouling; **7**:67-80, 1993.

Sites visitados

www.e-escola.pt, 20 de Junho de 2008

www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html, 23 de Junho de 2008

ANEXOS

ANEXO A1

Nesta secção encontra-se descrito o procedimento de preparação dos reagentes utilizados nos métodos de quantificação celular, nomeadamente, DAPI e CTC. Encontra-se também descrita a preparação do reagente de DNS.

Preparação de DNS

O reagente de DNS é preparado dissolvendo 5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico em 100 mL de NaOH a 2 mol.L⁻¹, a 80°C. Em paralelo, dissolve-se 150 g de tártaro duplo de sódio e de potássio em 250 mL de água destilada, também a 80°C. Após dissolução completa misturam-se ambas as soluções adicionando por fim 500 mL de água destilada. O reagente é armazenado à temperatura ambiente num frasco de vidro escuro.

Preparação do reagente do DAPI

A solução de DAPI a 0,01% (0,1 g/L) foi preparada dissolvendo 1 mg de DAPI (Merck) em 10 ml de água ultrapura num recipiente limpo e esterilizado. O procedimento foi realizado em condições de assepsia e de baixa luminosidade, e a solução guardada no frigorífico num recipiente protegido da luz.

Preparação do reagente do CTC

A solução de CTC foi preparada pela dissolução de 100 mg do reagente (Polysciences) em 6,6 mL de água ultrapura num recipiente limpo e estéril. A solução final obtida apresentava uma concentração igual a 50 mM, esta foi diluída até uma concentração de 4 mM de forma a ser utilizada como corante. O procedimento foi realizado em condições de assepsia e de pouca luminosidade e a solução guardada no frigorífico num recipiente protegido da luz.

ANEXO A2

Nesta secção encontram-se descritos os procedimentos aplicados nos métodos de quantificação celular, nomeadamente, DAPI, CTC e Kit Live/Dead.

DAPI

Para determinar o número total de células recorre-se ao Dapi. Esta técnica consiste na recolha de 1 ml de amostra que é filtrada por pressão sobre uma membrana de polycarbonato preta. Em seguida é adicionada algumas gotas do corante Dapi, e fica a incubar durante 15 minutos. Por fim adiciona-se 5ml de água estéril que é também filtrada por pressão. A contagem microscópica é realizada com o filtro com ampliação de 1000x.

A realização desta técnica envolveu o seguinte material:

- Membranas filtrantes de polycarbonato pretas com porosidade 0,22 μm e diâmetro 25 mm;
- Microscópio com sistema de epifluorescência (Leica), filtro A (gama de excitação UV);
- Óleo de imersão não fluorescente (Sigma);
- Pinça metálica;
- Pipetas estéreis;
- Sistema de filtração e bomba de vácuo;
- Solução aquosa de DAPI 0,1% (p/v) (Merck);

Kit Live/Dead

Para determinar o número de células viáveis recorre-se ao kit Live/Dead. O procedimento desta técnica consiste na recolha de 1 ml de amostra que é filtrada por pressão sobre uma membrana de polycarbonato preta. Em seguida é adicionado 1,5 µl de cada um dos corantes do kit. Por fim adiciona-se 5 ml de água estéril que é também filtrada por pressão. A contagem microscópica é realizada com o filtro UV com ampliação de 1000x.

A realização desta técnica envolveu o seguinte material:

- Ependorffs de 1,5 mL estéreis;
- Kit Live/Dead;
- Membranas filtrantes de polycarbonato pretas com porosidade 0,22 µm e diâmetro 25 mm;
- Microscópio com sistema de epifluorescência (Leica), filtro D (gama de excitação UV/Violeta);
- Óleo de imersão não fluorescente (Sigma);
- Pinça metálica;
- Pipetas estéreis;
- Sistema de filtração e bomba de vácuo;

CTC

Para determinar o número total de células metabolicamente activas recorre-se ao corante CTC. O procedimento desta técnica consiste na recolha de 2ml de amostra à qual é adicionada 0,25 mL de R₂B e 0,25 µL de CTC (4 mM). A mistura final é incubada durante 4 horas a 120 rpm no escuro a 28°C e em seguida filtrada por pressão sobre uma membrana de polycarbonato preta. Por fim adiciona-se 5 ml de água estéril que é também filtrada por pressão. A contagem microscópica é realizada com o filtro UV com ampliação de 1000x.

Os materiais e reagentes utilizados para realizar este ensaio foram:

- Frascos Schott estéreis (25 mL).
- Meio nutritivo (R₂B);
- Membranas de polycarbonato pretas com porosidade 0,22 µm e diâmetro 25mm;
- Microscópio com sistema de epifluorescência, filtro D (gama de excitação UV/Violeta);
- Óleo de imersão não fluorescente (Sigma);
- Pinça metálica;
- Pipetas estéreis;
- Sistema de filtração e bomba de vácuo;
- Solução aquosa de CTC 4 mM (Polysciences).

Anexo B

Nesta secção descreve-se a composição e a preparação dos meios de cultura de arranque.

Tabela B.1_Composição dos meios de cultura.

Constituintes	Concentração (g/L)
Glucose	5,50
Peptona	2,50
Extracto de levedura	1,25
KH_2PO_4	1,88
Na_2HPO_4	2,60

Dissolveu-se os constituintes da tabela C.1 em 1000 mL de água destilada e autoclavou-se a 121°C durante 20 minutos.

A alimentação fornecida ao sistema ao longo dos ensaios apresentava os mesmos constituintes que os pertencente ao meio da cultura de arranque e estes encontravam-se sempre na mesma proporção, no entanto para cada ensaio os valores das concentrações variavam.

Anexo C

A recolha de amostras de biofilme presentes nas células de fluxo foi realizada de acordo com o procedimento que se encontra esquematizado em seguida.

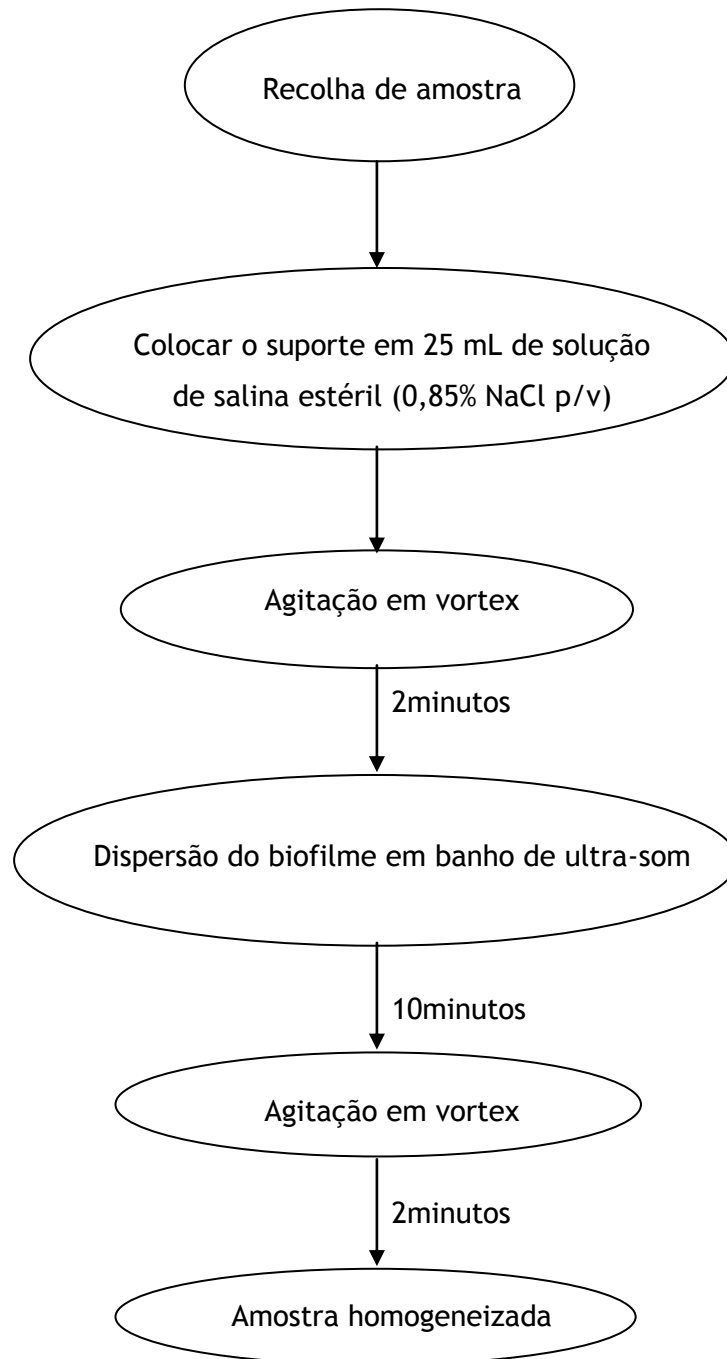


Figura C.1_Esquema do procedimento de recolha de amostra do biofilme aderido às superfícies de suporte, nas células de fluxo.

Anexo D

Descontaminação

Ao longo dos ensaios foi recolhida uma amostra da água estéril em circulação na instalação antes da inoculação da mesma para detectar se ocorreu contaminação.

A detecção da contaminação era realizada recorrendo ao método do DAPI, este permitia detectar a existência de células viáveis ou não viáveis na amostra recolhida. Em todos os casos não foi detectada a presença de células pelo método de DAPI, permitindo concluir que a descontaminação química foi eficaz.

Anexo E

O processo de inoculação do sistema com a bactéria *Pseudomonas fluorescens* envolve cinco passos diferentes:

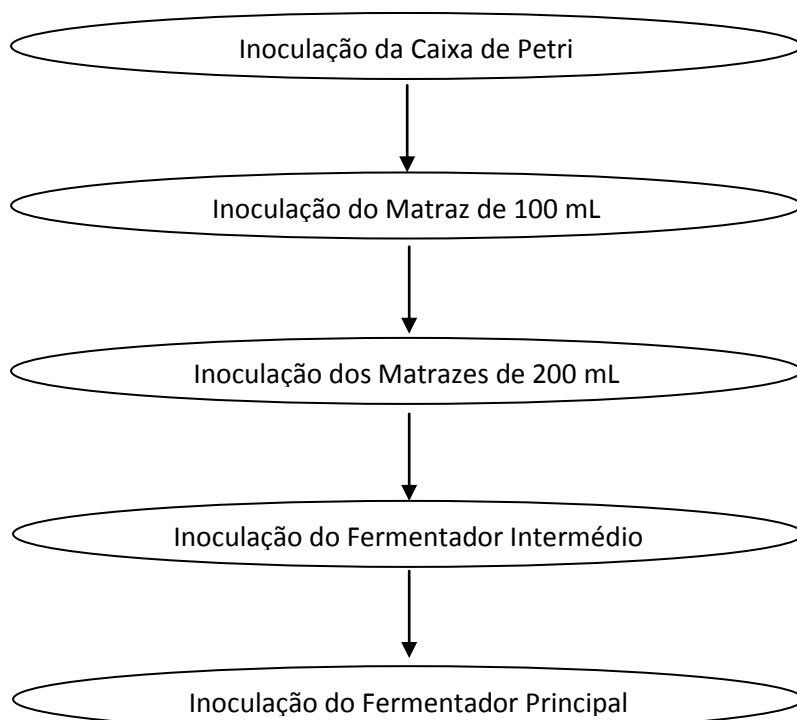


Figura E.1_Esquema de inoculação do reactor da instalação experimental apresentando todos os passos intermédios.

Anexo F

Contagem de bactérias totais

O valor do número total de bactérias tanto em biofilme como em suspensão é determinado recorrendo às seguintes expressões:

Biofilme:

$$\frac{n.^\circ \text{ células}}{\text{área de biofilme}} = \frac{n.^\circ \text{ células contadas}}{\text{área contada}} * \frac{\text{área da membrana}}{\text{volume filtrado}} * \frac{\text{diluição}}{\text{área da placa}} * \text{volume da amostra}$$

Suspensão:

$$\frac{n.^\circ \text{ células}}{\text{volume de suspensão}} = \frac{n.^\circ \text{ células contadas}}{\text{área contada}} * \frac{\text{área da membrana}}{\text{volume filtrado}} * \text{diluição}$$

Anexo G

O processo de recolha de amostras de biofilme envolve a alternância entre escoamento rápido/lento o que poderá originar o desprendimento esporádico de porções de biofilme aderidas ao suporte. Nalguns casos, os resultados obtidos para a massa de biofilme apresentavam pontos dispersos afectados pelo mencionado problema e que, por isso, foram rejeitados. A figura seguinte apresenta a evolução da massa de biofilme húmido por unidade de área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento, para concentração em nutrientes igual a 200 ppm, sem rejeição de pontos. Em particular, os dois últimos pontos poderão ter resultado de um desprendimento anormal de porções grandes de biofilme devido a possível falta de substrato nas zonas interiores do biofilme (que teve um crescimento mais significativo devido à elevada concentração de substrato).

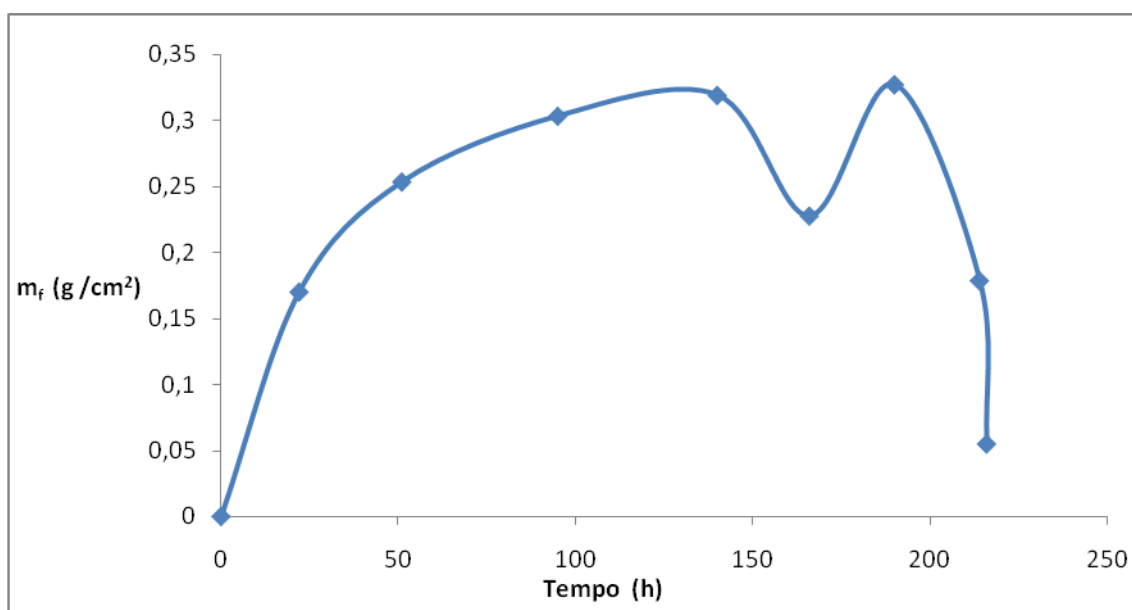


Figura G.1_Massa de biofilme húmido por área de placa, ao longo do tempo, em regime turbulento, para concentração em nutrientes igual a 200 ppm.

Anexo H

Nesta secção apresentam as imagens em microscópio electrónico obtidas para os métodos de microscopia de epifluorescência aplicados ao longo do projecto, nomeadamente, DAPI, kit Live/Dead, e ainda CTC.

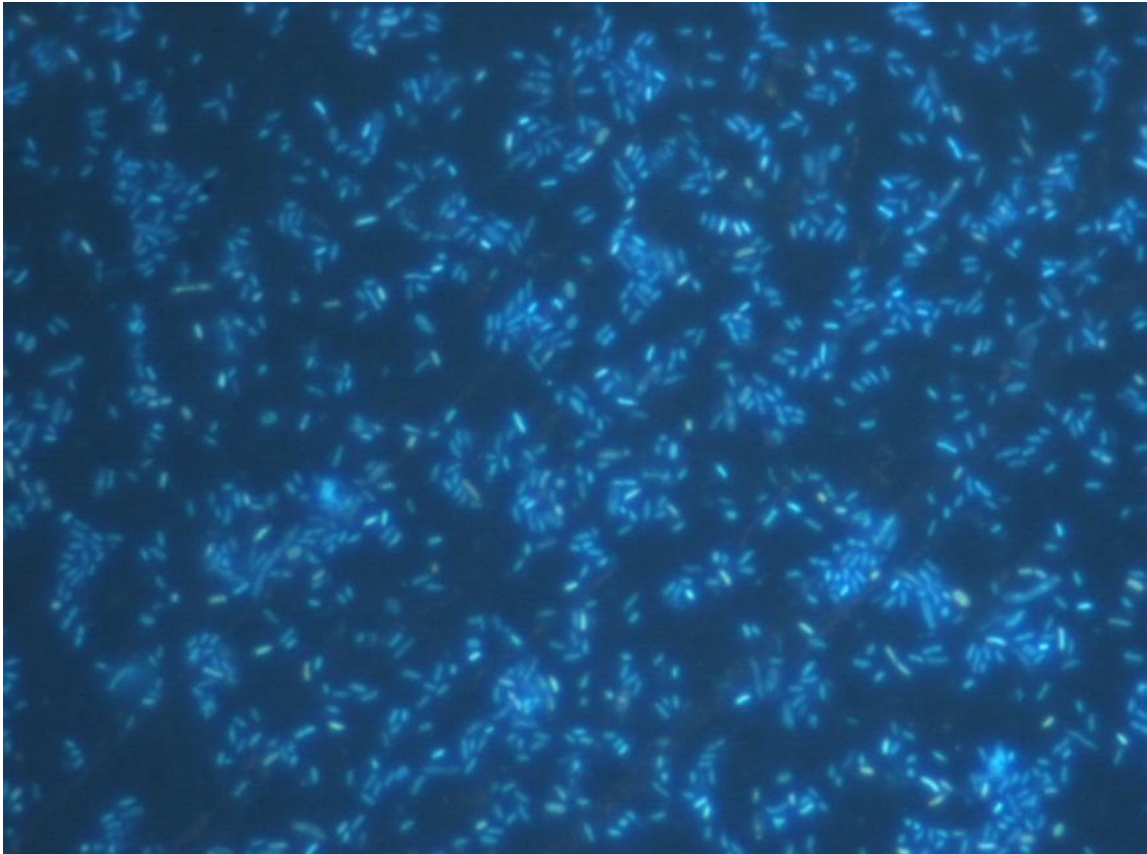


Figura H.1_Visualização de uma amostra diluída de biofilme em salina a 0,85%, formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com DAPI (ampliação 1000x).

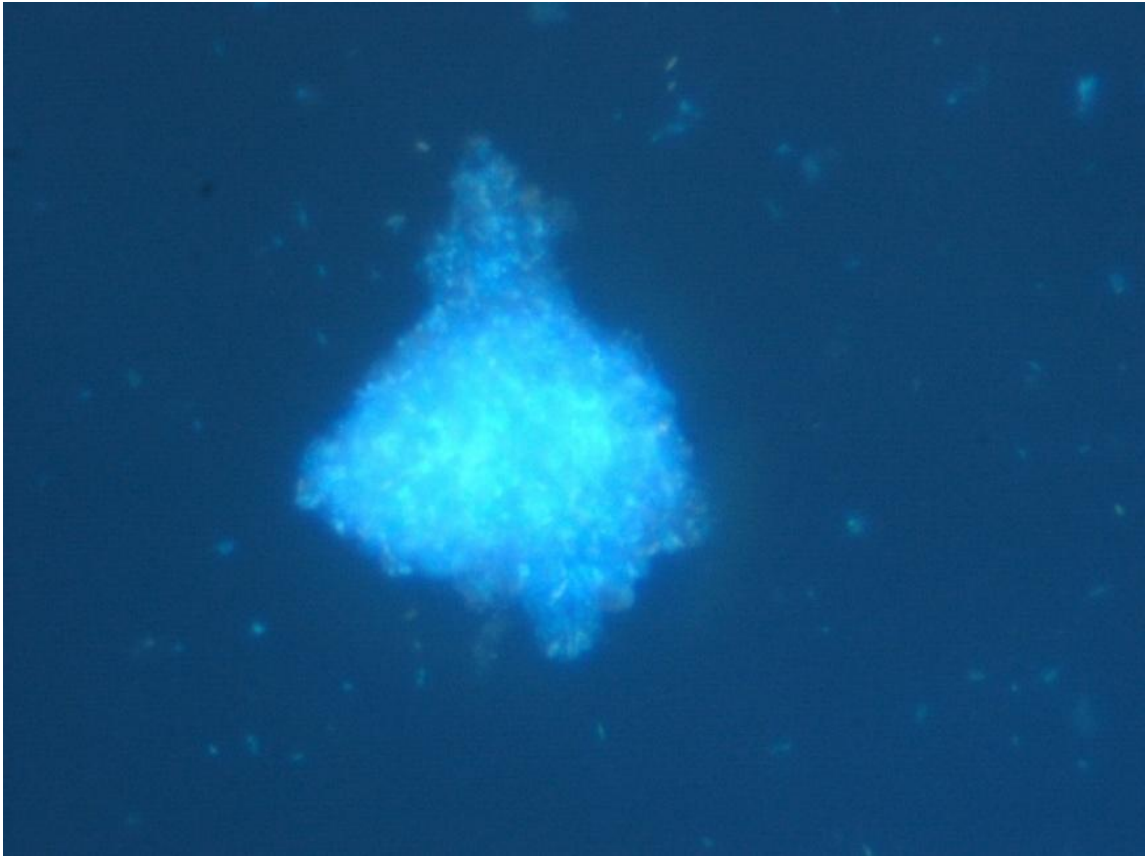


Figura H.2_Visualização de uma amostra de biofilme formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com DAPI (ampliação 1000x).

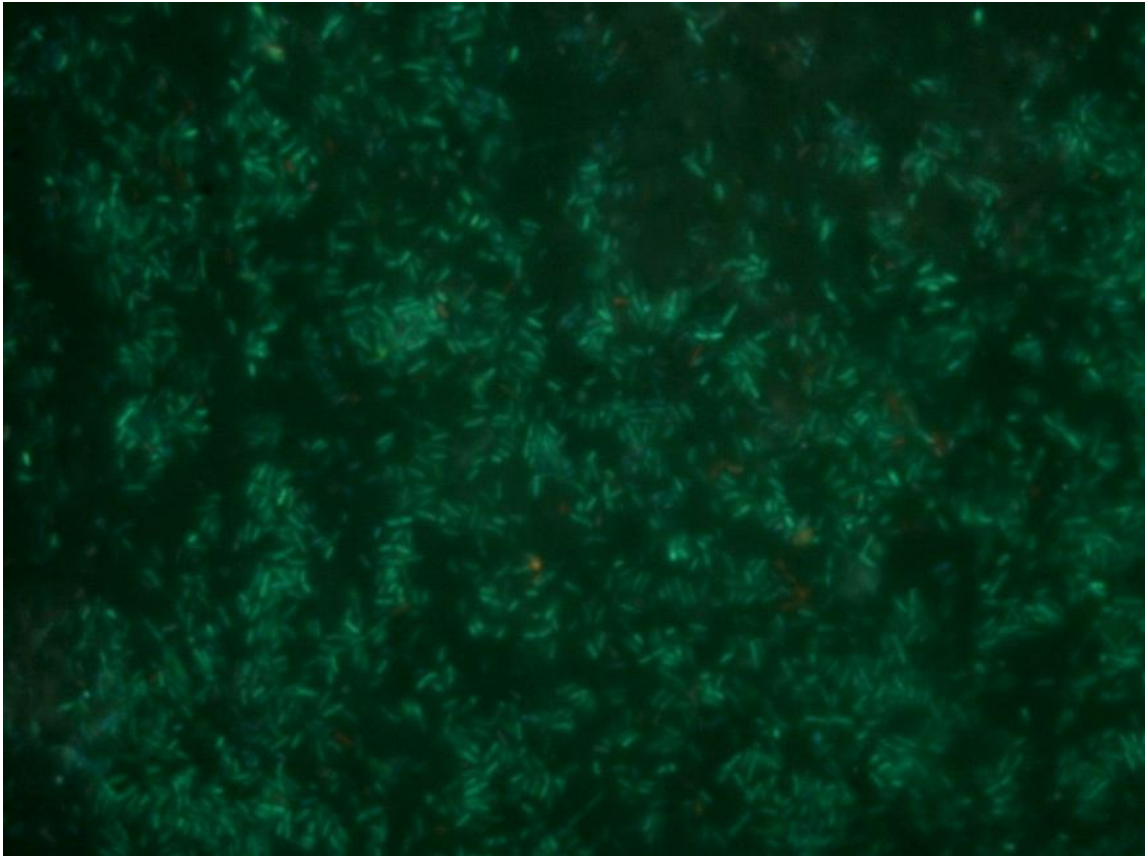


Figura H.3_Visualização de uma amostra diluída de biofilme formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com DAPI (ampliação 1000x).

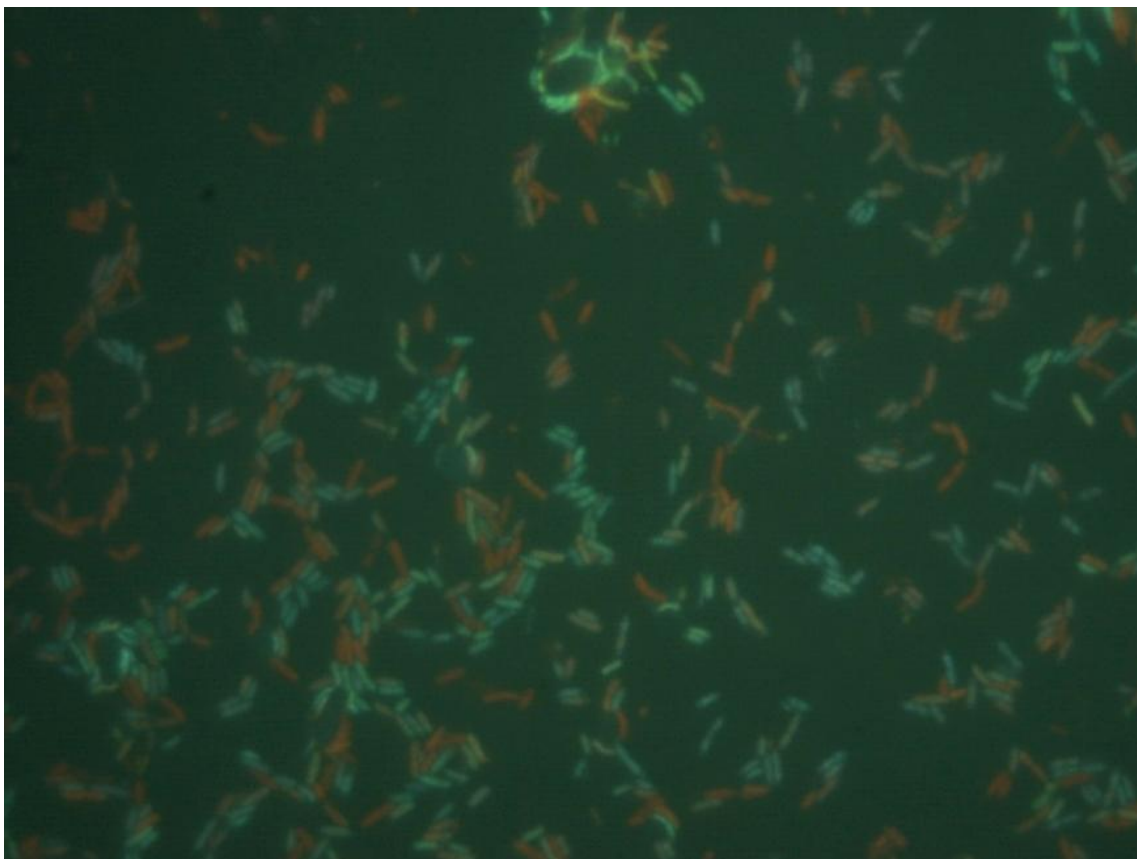


Figura H.4_Visualização de uma amostra diluída de biofilme em salina a 0,85%, formado em superfícies de PVC, em contacto com meio rico em carbono, em regime turbulento, por microscopia de epifluorescência com CTC (ampliação 1000x).

Anexo I

Ao longo do trabalho realizaram diversos cálculos recorrendo às formulas seguintes.

Determinação do número de Reynolds (Re):

$$Re = \frac{\rho \cdot \vartheta \cdot d}{\mu}$$

ρ = densidade do efluente da célula de fluxo

ϑ = velocidade de escoamento ao longo da célula de fluxo

d = diâmetro da célula de fluxo

μ = viscosidade do efluente da célula de fluxo

$$\vartheta = \frac{Q}{A}$$

$$d_h = \frac{4 \cdot \frac{\pi}{8} \cdot d^2}{\frac{\pi}{2} \cdot d + d}$$

Q = caudal de escoamento da célula de fluxo

A = área da célula de fluxo

d_h = diâmetro hidráulico

l = comprimento da célula de fluxo

$$A = \pi \cdot d \cdot l + 2 \cdot d \cdot l$$

Anexo J

Modelo matemático de desenvolvimento de um Biofilme

Exemplo de cálculo

Nesta secção indica-se todos os passos envolvidos na determinação dos parâmetros cinéticos do modelo matemático de desenvolvimento do biofilme para a concentração de glucose igual a 200 ppm em regime turbulento.

O valor de m_f^∞ foi obtido através do gráfico da massa de biofilme húmido por unidade de área e unidade de tempo.

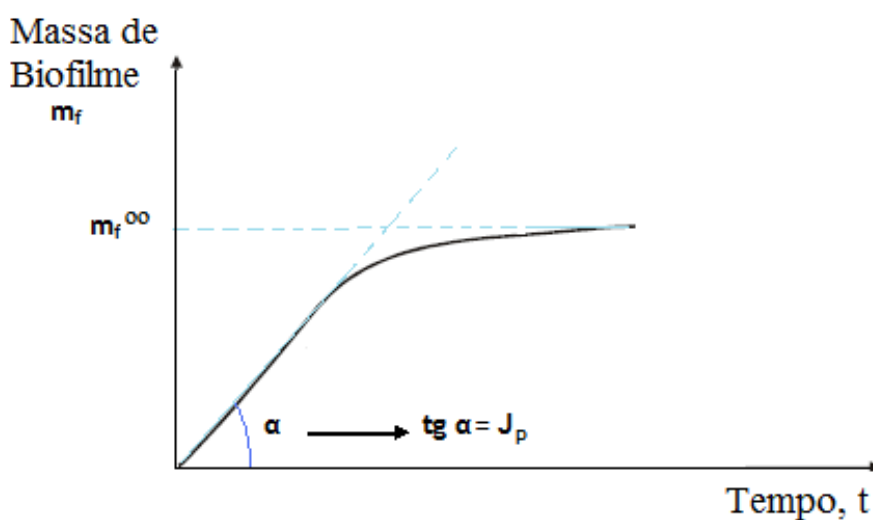


Figura J.1_ Representação da massa de biofilme por unidade de área de placa, ao longo do tempo.

Para a concentração de glucose igual a 200 ppm, obtém-se:

$$m_f^\infty = 3,29 * 10^6 \text{ mg.m}^{-2}$$

O valor de J_p é também obtido a partir do gráfico da massa de biofilme húmido por unidade de área e por unidade de tempo:

$$J_p = 21,44 \text{ mg.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

O consumo de substrato é determinado pela realização de um balanço material entre a concentração de glucose da alimentação e a concentração de glucose na célula de fluxo:

$$\text{Consumo de substrato} = [C_{\text{glucose}}(\text{alimentação}) - C_{\text{glucose}}(\text{efluente da célula de fluxo})] * Q$$

Em que:

$$Q = \text{caudal da alimentação}$$

$$C_{\text{glucose}}(\text{alimentação}) = 1000 \text{ ppm}$$

$$C_{\text{glucose}}(\text{efluente da célula de fluxo}) = 200 \text{ ppm}$$

Então para 200 ppm, com um caudal de 2 ml.min⁻¹, obtém-se:

$$\text{Consumo de substrato} = (1000 - 200) * 2,0 * 10^{-3} = 0,0267 \text{ mg.s}^{-1}$$

A determinação do valor de r_s^* (taxa de consumo de substrato) é realizada através da seguinte expressão:

$$r_s^* = \frac{\text{consumo de substrato}}{\text{área de biofilme}}$$

Em que a área de biofilme é igual a 0,215 m², logo:

$$r_s^* = \frac{0,0267}{0,215} = 0,124 \text{ mg.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$$

A determinação do valor de μ_p (taxa específica de crescimento de biofilme) é realizada através da seguinte expressão:

$$\mu_p = \frac{J_p}{m_f^\infty}$$

Logo:

$$\mu_p = \frac{21,44}{3,29 * 10^6} = 0,0234 \text{ h}^{-1}$$

A determinação de $Y_{F/S}$ (taxa de rendimento em biomassa) é realizado através da seguinte expressão:

$$Y_{F/S} = \frac{\mu_p \cdot \rho_f \cdot L_f}{r_s^*}$$

Em que:

ρ_f = densidade do efluente da célula de fluxo

L_f = espessura do biofilme húmido

Logo, para 200 ppm obtém-se:

$$L_f = 1,4 * 10^{-3} \text{ m}$$

Então:

$$Y_{F/S} = \frac{7,0 * 10^{-6} * 14 * 1,4 * 10^{-3}}{0,124 * 10^{-6}} = 1,10$$

A determinação do valor de $1/b$ (resistência ao desprendimento) é realizada através da seguinte expressão:

$$\frac{1}{b} = \frac{m_f^\infty}{J_p}$$

Para 200 ppm, obtém-se:

$$\left(\frac{1}{b}\right) * 10^{-5} = \left(\frac{3,29 * 10^6}{21,44}\right) * 10^{-5} = 1,53 \text{ s}^{-1}$$

Anexo K

Calculou-se o coeficiente de transferência de massa externo, k_m através das seguintes expressões matemáticas:

Determinação do número de Sherwood (Sh) e de Schmidt (Sc):

$$Sh = 0,023 Re^{0,8} Sc^{1/3}$$

Em que:

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot \mathcal{D}}$$

\mathcal{D} = difusividade da glucose na água

ρ = densidade do água

μ = viscosidade do água

O valor de k_m obtém-se a partir do valor de Sh, recorrendo à definição de número de Sherwood:

$$Sh = \frac{k_m \cdot d_h}{\mathcal{D}}$$

d_h = diâmetro hidráulico

Os valores utilizados neste cálculo foram:

$$d_h = 0,0196 \text{ m}$$

$$\mathcal{D} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$

$$Re = 5800$$

$$Sc = 800$$

$$\mu (\text{água a } 30^\circ\text{C}) = 8 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$$

$$\rho (\text{água a } 30^\circ\text{C}) = 1000 \text{ kg/m}^3$$

O coeficiente de transferência de massa externo obtido foi: $k_m = 1,1 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$.

Determinação do do valor de K_s e o valor de μ_{pmax} :

O valor de K_s (constante de saturação) e o valor de μ_{pmax} (valor máximo da taxa específica de produção de biofilme) foram determinadas recorrendo à equação de Monod:

$$\mu_p = \mu_{pmax} \frac{S}{K_s + S}$$

em que:

μ_p = taxa específica de produção de biofilme

μ_{pmax} = valor máximo da taxa específica de produção de biofilme

S = concentração de substrato no seio do líquido

S_i = concentração de substrato na interface biofilme – líquido

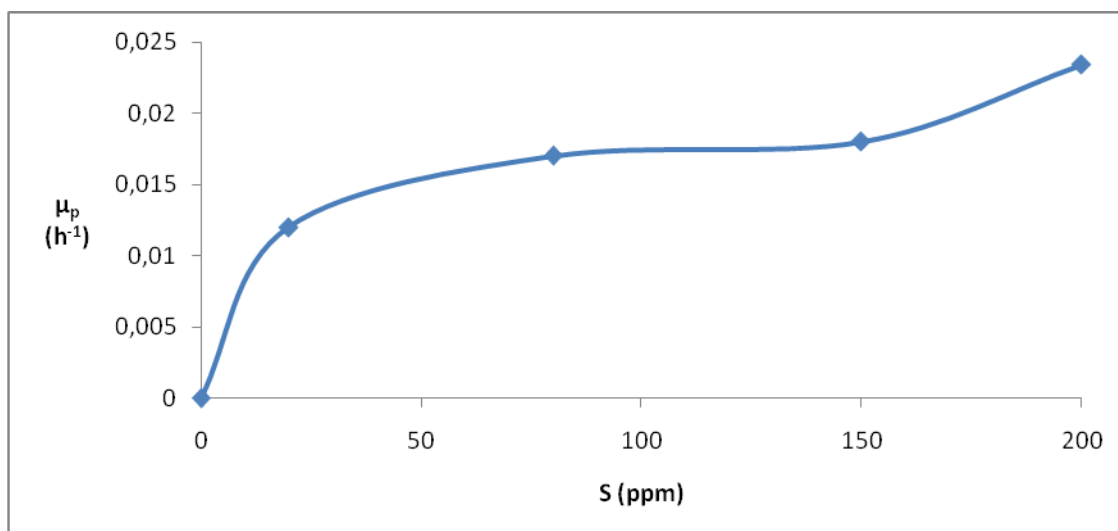


Figura K.1_Taxa específica de produção de biofilme (μ_p), para quatro diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo, nomeadamente, 20, 80, 150, 200 ppm, para regime turbulento.

Com os diferentes valores de μ_p indicados na figura K.1 para os respectivos valores de concentração de substrato, e recorrendo ao software *curves experts 1.3*, foi possível determinar os valores de K_s e μ_{pmax} . Na determinação destes parâmetros considerou-se que $S=S_i$, dado que a resistência à transferência de massa da glucose no seio do líquido é desprezável.

Valores obtidos: $K_s = 0,02 \text{ kg.m}^{-3}$ $\mu_{pmax} = 0,023 \text{ h}^{-1}$

Determinação do do valor de $K_{1/2}$:

O gráfico seguinte, representa as várias taxas de consumo de substrato em função da raiz quadrada do substrato (glucose).

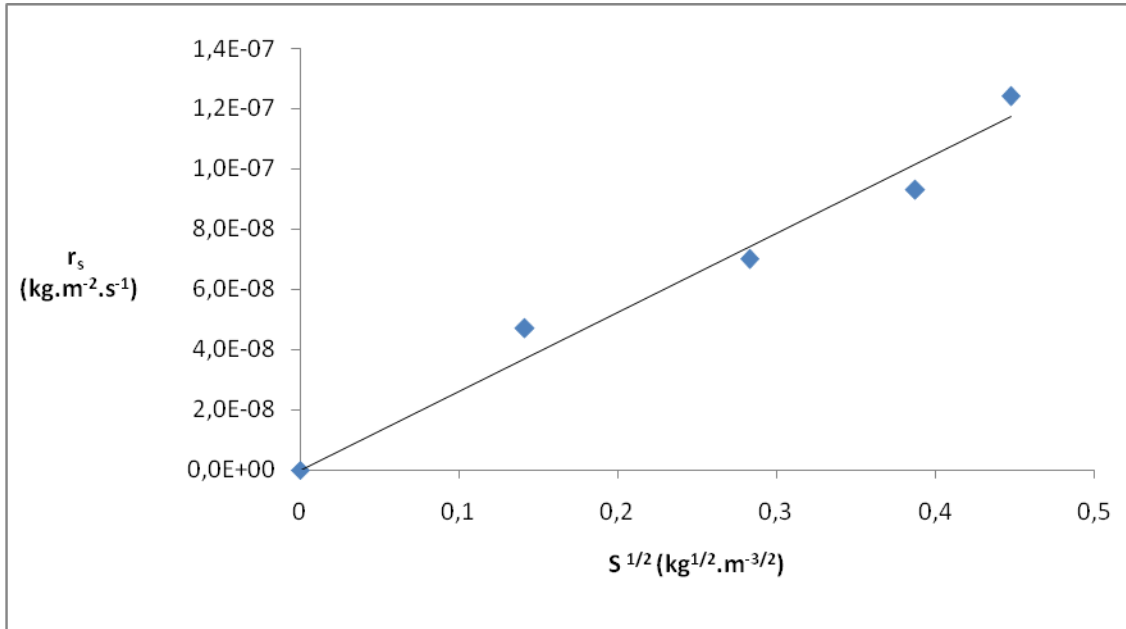


Figura K.2_Taxa de consumo de substrato (r_s^*) em função da raiz quadrada do substrato, para quatro diferentes concentrações de glucose na célula de fluxo, para regime turbulento.

O valor de $K_{1/2}$ corresponde ao declive da recta de r_s em função de $S^{1/2}$ e é dado por:

$$K_{1/2} = 2,62 \cdot 10^{-7} \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{m}^{-1/2} \cdot \text{s}^{-1}$$

Modelo de consumo de substrato em biofilmes

Exemplo de Cálculo

Determinação da difusividade (D_f) e constante de reacção (k_{1f}) no biofilme

Nesta secção indica-se se todos os passos envolvidos na determinação da difusividade da glucose no biofilme e também do valor de k_{1f} :

Admitindo que a 20 ppm a reacção intrínseca é de primeira ordem, utiliza-se a seguinte expressão na determinação de $\eta_i \cdot k_{1f}$:

$$r_s = \frac{S}{\frac{1}{k_m} + \frac{1}{\eta_i \cdot k_{1f} \cdot L_f}}$$

em que:

r_s = velocidade de reacção baseada na área da superfície

η_i = eficiência interna do biofilme

k_m = coeficiente de transferência de massa externo

S = concentração de substrato no seio do líquido

S_i = concentração de substrato na interface biofilme – líquido

L_f = espessura do biofilme húmido

k_{1f} = constante de velocidade de reacção de ordem 1

Os diferentes parâmetros obtidos para a concentração a 20ppm, estão apresentados a seguir:

$$r_s = 0,047 \text{ mg.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$$

$$L_f = 0,35 * 10^{-3} \text{ m}$$

$$S = 20 \text{ ppm}$$

O valor de k_m foi determinado anteriormente, e é igual a:

$$k_m = 1,1 * 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

Com os valores dos respectivos parâmetros substituindo na equação anterior obtém-se:

$$4,7 * 10^{-8} = \frac{20 * 10^{-3}}{\frac{1}{1,1 * 10^{-5}} + \frac{1}{\eta_i \cdot k_{1f} \cdot 3,5 * 10^{-4}}}$$

Isolando-se as incógnitas, obtém-se:

$$\eta_i \cdot k_{1f} = 8,54 * 10^{-3}$$

A eficiência interna é determinada recorrendo a:

$$\eta_i = \frac{\tanh \phi}{\phi}$$

Em que o módulo de Thiele (ϕ) é:

$$\phi = \sqrt{\frac{k_{1f} \cdot L_f^2}{D_f}}$$

Substituindo o valor da espessura do biofilme húmido:

$$\phi = \sqrt{\frac{k_{1f} \cdot (3,5 * 10^{-4})^2}{D_f}}$$

Logo:

$$\eta_i = \frac{\tanh \sqrt{\frac{k_{1f} \cdot L_f^2}{D_f}}}{\sqrt{\frac{k_{1f} \cdot L_f^2}{D_f}}}$$

em que:

D_f = difusividade da glucose no biofilme

Obtém-se:

$$8,54 * 10^{-3} = \frac{\tanh\left(\sqrt{\frac{k_{1f} \cdot (3,5 * 10^{-4})^2}{D_f}}\right)}{\sqrt{\frac{k_{1f} \cdot (3,5 * 10^{-4})^2}{D_f}}} * k_{1f}$$

Os valores de K_s e de $k_{\frac{1}{2}}$ foram determinados previamente. Com estes valores associados à equação apresentada acima é possível determinar valor de k_{1f} e D_f .

Assim, com o valor de $k_{\frac{1}{2}}$ igual a $2,62 * 10^{-7} \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{m}^{-1/2} \cdot \text{s}^{-1}$, obtém-se:

$$k_{\frac{1}{2}} = \sqrt{2 \cdot k_{of} \cdot D_f} = 2,62 * 10^{-7} \text{ kg}^{1/2} \cdot \text{m}^{-1/2} \cdot \text{s}^{-1}$$

em que:

$$K_{of} = 2 \cdot k_{1f} \cdot K_s$$

Como K_s é igual a $19,98 * 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$, obtém-se:

$$K_{of} = 2 \cdot k_{1f} \cdot 19 * 10^{-3}$$

Logo:

$$k_{\frac{1}{2}} = \sqrt{4 \cdot K_s \cdot k_{1f} \cdot D_f}$$

$$2,62 * 10^{-7} = \sqrt{4 * 19,98 * 10^{-3} * k_{1f} * D_f}$$

Resolvendo as duas equações em simultâneo determina-se o k_{1f} e D_f :

$$k_{1f} = 0,045 \text{ s}^{-1}$$

$$D_f = 2,01 * 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$$